N,N'-DIALKYL-1,2-DIPHENYL-ÄTHYLENDIAMINE

Synthese und Prüfung am DMBA-induzierten Mammatumor der Ratte

Eckhard Hoffmann

1975

N,N'-DIALKYL-1,2-DIPHENYL-ÄTHYLENDIAMINE: SYNTHESE UND PRÜFUNG AM DMBA-INDUZIERTEN MAMMATUMOR DER RATTE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Eckhard Hoffmann

aus Ahrensburg

München 1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Berichterstatter: 1. Professor Dr. H. Schönenberger

2. Professor Dr. F. Eiden

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Januar 1975

Druck: Steinbauer & Rau, München

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München auf Anregung von

Herrn Professor Dr. Helmut Schönenberger

angefertigt.

Für die stets großzügige Unterstützung und Förderung dieser Arbeit spreche ich Herrn Prof. Dr. H. Schönenberger meinen herzlichen Dank aus.

Ferner bin ich Herrn Prof. Dr. H.-D. Stachel und Herrn Prof. Dr. F. Eiden, Vorstände des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München zu großem Dank verpflichtet, für das mir entgegengebrachte persönliche Interesse und Wohlwollen.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr.med. Manfred Kiese, Vorstand des Pharmakologischen Instituts der Universität München, und Herrn Prof. Dr.med. Gerhard Lange, Pharmakologisches Institut der Universität München und Abteilung für Toxikologie der GSF in München, für die freundliche Aufnahme im Institut und die Förderung meiner pharmakologischen Untersuchungen.

Frau J. Siegerstetter vom Institut für Medizinische Datenverarbeitung der GSF in München danke ich herzlich für die freundliche Unterstützung und Beratung bei der Bearbeitung statistischer Fragen.

Ich danke Herrn Dr. R. Hiltmann, pharmazeutisch-wissenschaftliche Laboratorien der Farbenfabriken Bayer AG, und Frau I. Stekker für die Durchführung der Elementaranalysen und NMR-Spektren.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physik und Lebensmittelchemie der Universität Marburg auf Anregung von

Herrn Professor Dr. Hilmar Sommer-Bergen

ausgeführt.

Für die stete großzügige Unterstützung und fördernde Arbeit spreche ich diesem mein. Dank. Zu Dankbarkeit bin ich Herrn Dr. Hilmar Sommer-Bergen auch.

Ferner sein ich Herrn Prof. Dr. H. Stichel und Herrn Prof. Dr. E. Weber, Vorstande der Institute für Physik und Lebensmittelchemie der Universität Marburg für wertvolle und vorbildliche, Hilfe und Anregungen, Herrn Dr. Wolfgang Weber für die Aufnahme der Röntgenaufnahmen und Anfertigung der Kristallzeichnungen.

Meinen Eltern sei an dieser Stelle, für ihre Unterstützung, mein Dank ausgesprochen.

Herrn Prof. Dr. Hans Bernard Stoll, Vorstand des Instituts für Physikalische Chemie, der Universität Marburg, Herrn Prof. Dr. Ernst Lüder, Physikalisches Institut der Universität Innsbruck und Anregung der Tonbandgerät der Universität Innsbruck Herrn Dr. Hans Ziegler, Institut der Universität Innsbruck, für die Überlassung der Röntgenaufnahmen und die Durchführung einer mathematischen Untersuchung.

Herrn J. Stierstorfer von Institut für Mineralogie und Petrographie der Universität Innsbruck danke ich herzlich für die Ausführung der Dünnschliffe und die Durchführung einer Analyse und Herrn Prof. Dr. Hans Ziegler, Institut der Universität Innsbruck, für die Fremdmitteln Unterstützung und die Bereitstellung einer Kristallzeichnung, Pirsch.

Ich danke Herrn W. Bilkenroth, Chemisch-technische Laboratorien der Farbenfabrik Bayer AG, und Herrn E. Stecker für die Durchführung der Elementaranalysen und NMR-Spektren.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	Einleitung	1
	I. Das hormonabhängige Mammacarcinom des Menschen	
	1) Häufigkeit	1
	2) Therapeutische Maßnahmen	1
	II. Ausgangspunkt der Untersuchungen des Arbeitskreises	3
	1) Problemstellung	3
	2) Eigener Beitrag	5
B.	Chemie der N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamine	7
	I. Herstellung	7
	II. Trennung der Reaktionsprodukte und Ergebnisse der analytischen Verteilung	11
	1) Der Einfluß des N-Alkyl-Restes auf das Verteilungsverhalten	12
	2) Der Einfluß des Ringsubstituenten auf das Verteilungsverhalten	16
	III. Der Einfluß der Substituenten auf das molare Diastereomerenverhältnis und die Ausbeute an N-Alkylbenzylaminen	16
	IV. Sterische Zuordnung der N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochloride	17
	1) NMR-Daten	17
	2) Verteilungskoeffizienten	18

Seite

3) hRF-Werte 18

4) Schmelzpunkte 19

5) Ergebnisse 19

C. Prüfung auf tumorhemmende Wirkung am DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammatumor der Sprague-Dawley-Ratte 22

I. Der DMBA-induzierte Mammatumor als Testmodell für die Bewertung mammatumorhemmender Verbindungen 22

1) Induktion von Mammatumoren 22

2) Vorstellungen zur Carcinogenese 24

3) Cytostaticatherapie und Zellcyclus 25

4) Endokrine Therapie 28

a) Einfluß auf die hormonelle Wachstumsregulation 28

b) Beeinflussung von Stoffwechselprozessen 31

II. Wahl des geeigneten Induktionsschemas 33

III. Vorversuche 35

1) Durchführung 35

2) Auswertung 37

a) Statistische Bearbeitung der klassifizierten Tumorhäufigkeiten 40

b) Statistische Bearbeitung der mittleren Tumorzahlen am Versuchsbeginn und Versuchsende 40

3) Kritische Beurteilung 42

a) Tumormodell 42

b) Versuchsaufbau 43

Seite

IV. Eingehende Prüfung der N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamine auf tumorhemmende Wirkung unter Verwendung verschiedener Applikationsarten 44

1) Orale Applikation durch Futterpellets 44

a) Versuchsaufbau 44

b) Auswertung 45

c) Zusammenhänge zwischen Substanzkonzentration, Futteraufnahme, Körpergewicht und Tumorhemmung 45

2) Orale Applikation in Form von Milchemulsion 50

a) Versuchsaufbau 50

b) Auswertung 51

3) Applikation durch intraperitoneale Injektion, orale Verabreichung mit der Schlundsonde und Verfütterung in Form von Mikrokapseln 54

a) Versuchsaufbau 55

b) Auswertung 56

α) Auswertung der klassifizierten Tumorhäufigkeiten mit kx2-Felder-Tafeln 56

ß) Auswertung der Tumorflächenänderung mit Hilfe der Varianzanalyse 60

c) Klärung der Frage nach anorexigener Wirkung 66

V. Vergleichende Tumorhemmung mit anderen therapeutischen Methoden 71

1) Tumorhemmung mit Diäthylstilböstrol 71

2) Tumorhemmung durch Ovarektomie 74

3) Tumorhemmung durch Futtereinschränkung 77

a) von hormonabhängigen Tumoren 77

Seite

b) von hormonunabhängigen Tumoren 77

c) Diskussion 78

VI. Diskussion 83

D. Experimenteller Teil 90

I. Herstellung der N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamine 90

1) Synthese der Schiff'schen Basen 90

A Ringunsubstituierte Alkyl-benzyliden-amine 90

B Ringsubstituierte Butyl-benzyliden-amine 93

2) Reduktion der Schiff'schen Basen 95

A Reduktionsprodukte der ringunsubstituierten Alkyl-benzyliden-amine 98

B Reduktionsprodukte der ringsubstituierten Butyl-benzyliden-amine 110

3) Multiplikative Verteilung der Reaktionsgemische 120

4) NMR-Messungen 121

5) Bestimmung der hRF-Werte 122

6) Schmelzpunkte 122

II. Prüfung der N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamine auf tumorhemmende Wirkung 123

1) Bestimmung der akuten Toxizität 123

2) Die Erzeugung von Mammatumoren bei SD-Ratten mit DMBA 125

a) Induktion 125

b) Tumorausbeuten 125

Seite

c) Tumormessung und Datenerfassung 128

3) Therapieschema der Vorversuche 129

4) Therapieschema der Hauptversuche 130

a) Orale Applikation im Futter 130

b) Orale Applikation in Milch 130

c) Intraperitoneale Applikation 131

d) Orale Applikation mit der Schlundsonde 132

III. Prüfung von Diäthylstilböstrol auf tumorhemmende Wirkung 133

IV. Tumorhemmung durch Ovarektomie 134

V. Tumorhemmung durch Futtereinschränkung 135

1) Bei jungen hormonabhängigen Tumoren 135

2) Bei alten hormonunabhängigen Tumoren 135

a) Prüfung der Hormonunabhängigkeit 135

b) Futtereinschränkung 136

E. Statistischer Teil 137

I. H-Test nach KRUSKAL und WALLIS 137

1) Der Vergleich der Tumorzahlen aus den Vorversuchen am Versuchsanfang 137

2) Vergleich der während der Versuche neu auftretenden Tumoren 138

II. Berechnung des Korrelationskoeffizienten für den Zusammenhang zwischen Tiergewichtsreduktion und Tumorwachstum 139

Seite

III. Auswertung von Häufigkeiten mit kx2-Felder-Tafeln 141

1) Vergleich der Tumorhäufigkeiten bei den Versuchen mit Milchemulsion 141

2) Vergleich der Tumorhäufigkeiten bei den Versuchen mit Milchemulsion(ohne Behandlungsgruppe 11a) 142

3) Vergleich der Tumorhäufigkeiten bei verschiedenen Applikationsarten nach drei Wochen, unter Zerlegung der Freiheitsgrade 143

4) Vergleich der Tumorhäufigkeiten bei verschiedenen Applikationsarten nach sechs Wochen, unter Zerlegung der Freiheitsgrade 145

VI. Varianzanalyse: Auswertung der prozentualen Tumorflächenänderungen(Varianzanalyse zeitlicher Verlaufsreihen) 147

a) Voraussetzungen 147

b) Modellbeschreibung 147

c) Auswertung 148

d) Streuungszerlegung 149

e) Ergebnis 150

f) Lineare Kontraste nach SCHEFFÉ 150

V. WILCOXON-Rangtest zweier unverbundener Stichproben 152

1) Vergleich des Futterverbrauchs der Behandlungsgruppe 23a(Schlundsonde) und der Kontrollgruppe 152

2) Vergleich des Futterverbrauchs der Behandlungsgruppe 25a und der Kontrollgruppe 153

Seite

F. Zusammenfassung 154

G. Literaturverzeichnis 156

A. EINLEITUNG

I. Das hormonabhängige Mammacarcinom des Menschen

1) Häufigkeit

Der Brustkrebs gehört zu den häufigsten Tumorerkrankungen; jede 30.-40. Frau wird davon betroffen. Bei einem Drittel der Patientinnen ist zum Zeitpunkt der Diagnose eine kurative Therapie nicht mehr möglich.

2) Therapeutische Maßnahmen

Für lokalisierte, nicht metastasierende Tumoren sind Chirurgie und Strahlentherapie die geeigneten Verfahren, sie weisen eine hohe Heilungsquote auf. Bei generalisierenden und rezidivierenden Tumoren ist eine internistische Therapie indiziert, die aber nur noch zu temporären Remissionen mit Lebensverlängerungen führt.

Für eine internistische Therapie kommen folgende Verfahren in Betracht
a) Behandlung mit alkylierenden Cytostatica, Antimetaboliten und Antibiotica; die erzielbaren Effekte gehen über eine zeitlich begrenzte Hemmung der Tumoren nicht hinaus; die internistische Therapie wird durch starke Nebenwirkungen beeinträchtigt.
b) Endokrine Therapie durch Hormonentzug oder Hormonzufuhr; dadurch werden nur die hormonabhängigen Tumoren(ca.35% aller Fälle) beeinflußt (Dauer der Remission im Mittel 10 Monate). Später erneut auftretende Tumoren entwickeln sich wahrscheinlich aus autonomen Tumorzellen in den hormonabhängigen Mammatumoren.

Hormonentzug wird durch Ovarektomie, Adrenalektomie und Hypophysektomie erreicht, wobei diese Maßnahmen, je nach Notwendigkeit, chronologisch durchgeführt werden. Da auch nach Hypophysektomie noch Östrogene im Urin nachweisbar sind, vermutet man eine Östrogenproduktion im Tumor und durch accessorische Nebennierengewebe. Neben der Bildung von Tumoren aus autonomen Krebszellen könnte dieser Vorgang für den Mißerfolg der ablativen Chirurgie verantwortlich sein.

Für die Hormontherapie werden Androgene, Östrogene, Gestagene und auch Corticoide verwendet.
Die Wirkung der Androgene beruht wahrscheinlich auf ihren antiöstrogenen Eigenschaften (medikamentöse Ovarektomie bzw. Hypophysektomie). Bei einer Erfolgsqote von 20% sind Nebenwirkungen wie Virilisierung, Wasserretention, Hypertonie und Hypercalciämie in Kauf zu nehmen.

Östrogen in hohen Dosen führt in 35% der Fälle zu Wachstumshemmungen und bewirken daneben Wasserretention, Uterusblutungen und Hypercalciämie.

Progesteron ist allein oder zusammen mit Östrogenen bei geringen Nebenwirkungen ähnlich wirksam.

War es bisher üblich, nur Postmenopause-Patientinnen mit Östrogenen wie Diäthylstilböstrol(DES) und Hexöstrol(HES) zu behandeln, so hat es sich inzwischen herausgestellt, daß auch Frauen in der Prämenopause erfolgreich damit behandelt werden können (1). Patientinnen mit Metastasen sprechen zu 20% auf diese Therapie an.

II. Ausgangspunkt der Untersuchungen des Arbeitskreises

Ausgangspunkt der Untersuchungen unseres Arbeitskreises sind die synthetischen Östrogene Diäthylstilböstrol(DES) und Hexöstrol(HES). Beide Stoffe hemmen das Wachstum von hormonabhängigen Mammatumoren. Möglicherweise beruht diese Wirkung auf cytotoxischen Eigenschaften, die durch Anreicherung dieser Stoffe im hormonempfindlichen Tumorgewebe verstärkt zur Geltung kommen(2), oder auf einem Prolaktinantagonismus in der Tumorzelle(3).

Es wird auch von Hemmeffekten am hormonunabhängigen Walker-256-Rattentumor durch HES (4) und durch DES und HES an Tumorzellkulturen berichtet(5). Ferner sind bei DES antimikrobielle Wirkungen nachweisbar(6,7), die ebenfalls auf cytotoxische Eigenschaften hinweisen.
Unter den zahlreichen Nebenwirkungen fallen für den Menschen besonders ins Gewicht: Inappetenz, Übelkeit, Abbruchblutungen, Wasserretention und Hypercalciämie (8). Die Mehrzahl der Nebenwirkungen beruht auf den östrogenen Eigenschaften dieser beiden Stoffe.

1) Problemstellung

Es wird davon ausgegangen, daß die cytotoxischen Eigenschaften von HES und DES an der antitumoralen Wirkung wesentlich beteiligt sind, und daß ihre Anreicherung als Folge der östrogenen Wirkung, d.h.der Wechselbeziehung mit dem Östradiolrezeptoren des Tumors, eine selektive cytotoxische Wirkung auf hormonabhängige Tumoren bedingt.Gleichzeitig rufen die östrogenen Eigenschaften Nebenwirkungen und,bei zu niedriger

Dosierung, Tumorwachstumsstimulierung hervor. Es besteht daher das Problem, diese Nebenwirkungen durch synthetische Abwandlung des DES bzw. HES von der Antitumorwirkung abzutrennen, α) ohne die Fähigkeit zur Anreicherung im hormonabhängigen Tumor zu beeinflussen, und ß) ohne die cytostatischen Eigenschaften zu reduzieren.

zu α) Dieses Ziel wird erreicht, wenn die chemische Abwandlung zu einem Antiöstrogen führt, also einer Substanz mit Affinität zum Östradiolrezeptor, aber ohne agonistische Wirkung. Solche Verbindungen würden neben ihrer möglichen cytotoxischen Wirkung durch Östrogen-Antagonismus eine Art chemische Ovarektomie hervorrufen. Die Anreicherung in der Tumorzelle kann eventuell durch den Einbau basischer Zentren in das DES- bzw. HES-Molekül weiter verbessert werden. Der passive Transport solcher Verbindungen würde über eine Veränderung des Verteilungsgleichgewichts, aufgrund der erhöhten Protonenkonzentration in der Tumorzelle, positiv beeinflußt (9).

zu ß) Die unter α) aufgeführte Abwandlung von DES und HES könnte so vorgenommen werden, daß es, unter Erhaltung der Rezeptoraffinität, durch den Einbau von Wirkgruppierungen (z.B. Aziridinreste) zu einer Steigerung der cytotoxischen Eigenschaften kommt.

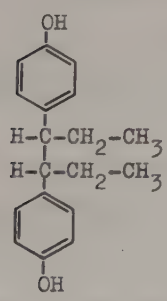
Bei allen Verbindungen, die aufgrund dieser Überlegungen hergestellt werden, ist es notwendig, sie jeweils mit DES bzw. HES vergleichend zu prüfen auf: a) cytostatische Wirkungen, b) Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung, c) östrogene und d) mammatumorhemmende Wirkung.

Korrelieren die Ergebnisse von b) und d) positiv, dann sind die

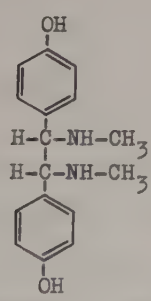
antiöstrogenen Eigenschaften die Ursache der tumorhemmenden Wirkung. Korrelieren a) und d) positiv, dann stehen die cytotoxischen Eigenschaften im Vordergrund. Ideal wäre die Kombination dieser Eigenschaften- positive Korrelation von a), b) und d).

2. Eigener Beitrag

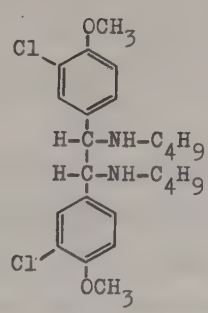
Ein häufig benutztes Verfahren zur Modifizierung von Wirkungsqualitäten eines Pharmakons ist der Austausch von Molekülgruppierungen durch isostere Glieder (Bioisosterieprinzip)(9). Es wurde im Arbeitskreis zur Synthese mammatumorhemmender Verbindungen, ausgehend von HES, benutzt (9). Der einfache, hier beschrittene Weg, Ersatz der C-Atome 2 und 5 von HES durch NH, ermöglicht eine weitgehende Erhaltung der HES-Raumstruktur.



I



II



III

Das isostere Hexöstrol(II) zeigte bei der Prüfung am Ehrlichschen Ascitestumor der Maus im Gegensatz zu homologen N-Alkyl-Derivaten von II keine Hemmwirkung (9). Am Dimethylbenzanthracen-

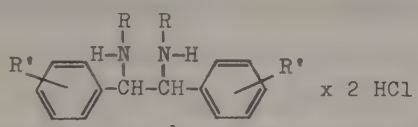
induzierten Mammatumor der Sprague-Dawley-Ratte wurden II und II-Derivate bisher nicht getestet, jedoch erwies sich die Verbindung racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di(-3-chlor-4-methoxi-phenyl)-äthylendiaminn (III) als wirksam(10). Die Prüfung von III an hormonunabhängigen Tumoren, wie dem Yoshida-Sarkom der Ratte, ergab keine Beeinflussung der Tumorentwicklung. Der Hemmeffekt an Mastocytom-P-815-Zellen ist gering, antimikrobielle Wirkungen fehlen(10). Bei III handelt es sich um eine Verbindung mit einer mammatumorspezifischen Wirkung.

Die Aufgabe dieser Arbeit ist es, durch Variation der N-Alkyl-Kette und Einführung verschiedener Ringsubstituenten systematisch abgewandelte N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamine(ÄDA) herzustellen und diese Verbindungen am DMBA-induzierten, hormonabhängigen Mammatumor der Ratte zu prüfen. Die mammatumorhemmende Wirkung der ÄDA soll mit der von DES und Ovarektomie verglichen werden.

B. CHEMIE DER N,N'-DIALKYL-1,2-DIPHENYL-ÄTHYLENDIAMINE

I. Herstellung

Es wurden zwei Gruppen von N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochloriden(ÄDAx2HCl) hergestellt:



a , b

Substanzgruppe A: R = Alkyl C_1-C_6, gerad- und verzweigtkettig,
(Tabelle 1 A) R'= H
Substanzen Nr. 1a - 16a (Racemate), Nr. 1b - 16b (Mesoformen);

Substanzgruppe B: R = n-Butyl,
(Tabelle 1 B) R'= CH_3, F, Cl, Br, J in 2-, 3- oder 4-Stellung
Substanzen Nr.17a - 29a (Racemate), Nr.17b - 29b (Mesoformen).

Für die Herstellung von N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiaminen (ÄDA) bietet sich die Reduktion von Schiff'schen Basen mit verschiedenen Reduktionsmitteln an, da sich unter geeigneten Bedingungen neben den normalerweise entstehenden, sekundären Aminen hauptsächlich Dimerprodukte bilden.

Als Reduktionsmittel kommen in Frage:

a) Grignardverbindungen mit verzweigten Alkylketten (11,12), denen Schwermetallsalze wie $MnCl_2$ oder $TiCl_2$ zugesetzt werden,

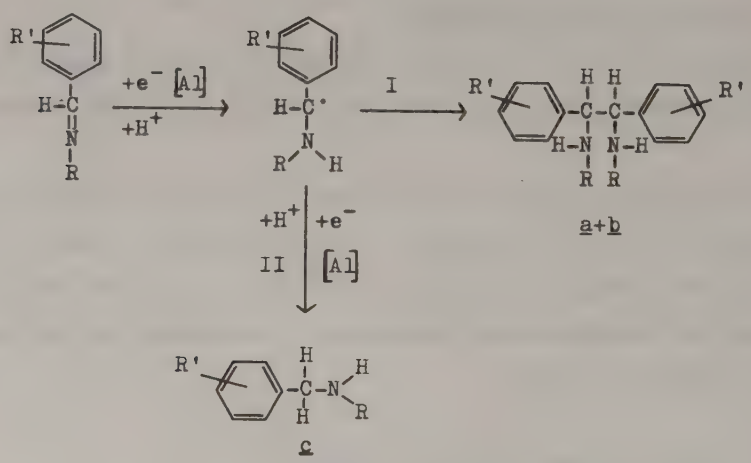
b) binäre Mg/MgJ_2-gemische (13,14),

c) $HgCl_2$-aktiviertes Aluminium (15,16),

d) Benzpinacol (17).

Die Umsetzungen mit Grignardverbindungen und dem binären Gemisch Mg/MgJ_2 spielen nur eine untergeordnete Rolle, da sie nicht in allen Fällen quantitativ verlaufen, oder die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten die Isolierung der Amine zusätzlich erschwert.

Daher wurden alle Verbindungen durch die Reduktion von Schiff'schen Basen mit aktiviertem Aluminium *), unter Zusatz der für die ÄDA-Bildung optimalen Äthanolmenge (18), in siedendem Toluol hergestellt (=Syntheseweg a).

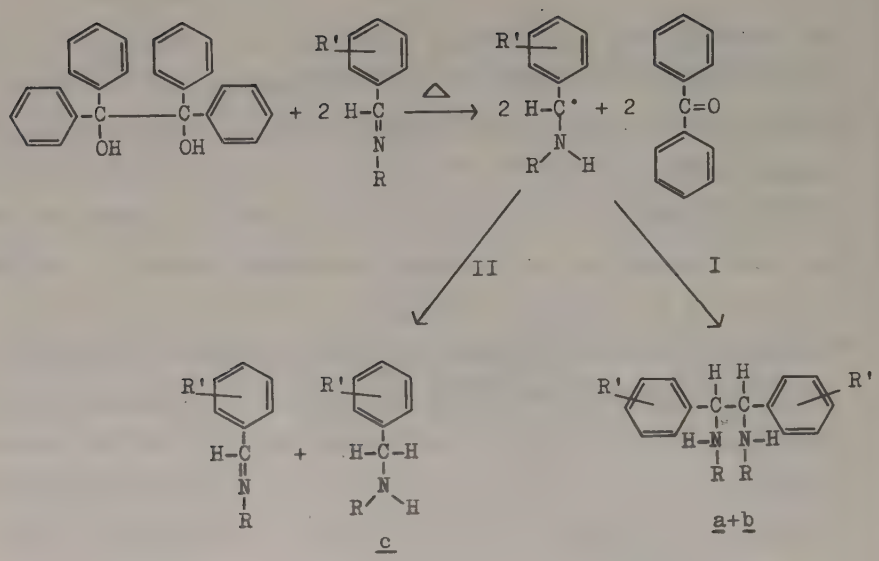


*) Vorversuche zur Reduktion der Schiff'schen Basen Nr. 2, 3, 4, 5, 9, 23, 24, und 25 wurden von G.GRIEBL durchgeführt.

Reaktionsschema für Syntheseweg a

Die Reduktion von Alkyl-benzyliden-aminen mit aktiviertem Aluminium in Äthanol/Toluol beginnt mit der Anlagerung von Imin- und Alkohol-Molekülen über freie Elektronenpaare an der Aluminiumoberfläche (18-21):
"In der Adsorptionsschicht bilden sich zwischen benachbarten Äthanol- und Basenmolekülen Wasserstoffbrückenbindungen aus, die die Schiff'sche Base stärker fixieren und ihre Desorption erschweren. Im Primärschritt der Reduktion geht das Aldimin durch Aufnahme eines Elektrons aus der Metalloberfläche in das entsprechende Aldimylradikal über, das mit einem zweiten Radikal gleicher Art reagiert (I), oder durch Aufnahme eines weiteren Elektrons über die Stufe eines Carbanions und anschließender Äthanolyse zum Monomerprodukt (c) reduziert (II) wird."(19)
Dabei sind die Ausbeuteverhältnisse (a+b):c u.a. stark von der Iminstruktur abhängig.

Da bei der Reduktion von Butyl-(3-jod-benzyliden)-amin (29) nur die meso-Form isoliert werden konnte, wurde zusätzlich bei dieser und einigen weiteren Schiff'schen Basen (6, 7, 8, 11) Benzpinacol in Isopropanol (modifiziert nach (17), = Syntheseweg b) verwendet; dabei wurde die Schiff'sche Base fünf Tage lang zusammen mit Benzpinacol in Isopropanol unter Rückfluß erhitzt.



Reaktionsschema für Syntheseweg b

Nach (17) bilden die durch thermische Spaltung des Benzpinacols entstehenden Ketylradikale aus den Schiff'schen Basen Aldimylradikale, die sowohl dimerisieren (I) als auch disproportionieren(II). Auch hier sind die Ausbeuteverhältnisse stark von der Iminstruktur abhängig.

II. Trennung der Reduktionsprodukte und Ergebnisse der analytischen Verteilung

Die nach B.I. gewonnenen Reduktionsprodukte stellen salzsaure Amingemische dar, die die beiden diastereomeren ÄDAx2HCl und das monomere N-Alkyl-benzyl-amin-hydrochlorid enthalten. Letzteres wurde als Base durch Vakuumdestillation abgetrennt. Die diastereomeren ÄDA-Basen konnten in Form ihrer Hydrochloride meistens durch analytische Craigverteilung getrennt und quantitativ bestimmt werden(Beschreibung im exp.Teil, analog (22,23)). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 A aufgeführt.
Durch geeignete Kristallisationsverfahren ließen sich die diastereomeren ÄDA-Basen bis auf zwei N-Hexyl-Produkte auch im präparativen Maßstab trennen und in reiner Form darstellen.

In Stoffgruppe A (ringunsubstituierte ÄDA) ließen sich alle Verbindungen mit einer N-Alkyl-Kettenlänge von 3-5 C-Atomen durch 24-stufige Craigverteilung in den Lösungsmittelsystemen Chloroform-Methanol-HCl 0,36%, 2% und 3,6% (LS 1-3) trennen. Bei den N-Äthyl-Verb. 2ab war die Trennung in LS 5 (Chloroform-Methanol-Puffer p_H 5,5) mit 100 Verteilungsschritten möglich, während bei den N-Methyl-Verb. 1ab eine Auftrennung mißlang. Das Diastereomerenverhältnis wurde hier durch quantitative NMR-Messung, aufgrund der unterschiedlichen Bandenlage der N-Methyl-Protonen der Racem- und Mesoform (24) bestimmt.
Bei 6 C-Atomen im N-Alkyl-Rest gelang die Trennung nur noch unter Zusatz von Ligroin zum Lösungsmittelsystem Chloroform-Methanol-HCl 3,2% (LS 4, 24 Verteilungsschritte), mit Ausnahme der Verb.

12ab und 15ab, bei denen keine Trennung gelang.

In der Stoffgruppe B (mit Methyl oder Halogen im Ring monosubstituierte ÄDA) konnten in LS 2 (Chloroform-Methanol-HCl 0,36%) bzw. LS 4 (s.o.) alle diastereomeren ÄDA getrennt werden, mit Ausnahme der 2-Brom-Verb. 26ab, bei deren Herstellung ein Vielkomponentengemisch entstand, das bis auf ein abdestilliertes, bromfreies "Monomer"-Produkt nicht analysiertwerden konnte(Ergebnisse in Tab.1 B).

Die Verteilung der ÄDAx2HCl in LS 1-4 erfolgt als Ionenpaare (9). Nach HIGUCHI (25,26) ist das Verteilungsgleichgewicht für Ionenpaare u.a. von der Cl^- Konzentration, vom pH und von dem Anteil solvatisierender Lösungsmittel (Chloroform, höh.Alkohole, Phenole) in der org. Phase abhängig. Da wir verschiedene Lösungsmittelsysteme verwenden mußten (in LS 4 ist z.B. das Chloroform durch das die Löslichkeit der Ionenpaare reduzierende Ligroin verdünnt), lassen sich die folgenden Ausführungen nur bedingt verallgemeinern.

1) Der Einfluß des N-Alkyl-Restes auf das Verteilungsverhalten

Die Verteilungszahlen G_a und G_b, die das Verhältnis der Stoffkonzentration in der leichten Phase(c_l) zur Stoffkonzentration in der schweren Phase(c_s) wiedergeben ($G=\frac{c_l}{c_s}$), haben folgende Beziehung zum Verteilungskoeffizienten K : $G = K \times V$, wobei V das Volumenverhältnis der leichten zur schweren Phase darstellt. Der Quotient aus den Verteilungszahlen G_a und G_b ist der Trennfaktor ß ($G_a/G_b=ß$), der ein Maß für die Trennbarkeit eines Substanzgemisches darstellt. Je größer ß ist, umso leichter kann ein

Gemisch getrennt werden.

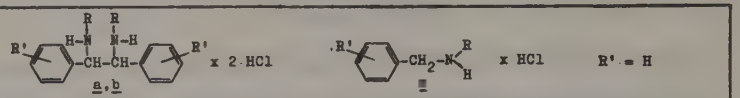
Der Vergleich der Verteilungszahlen G_a und G_b bzw. des Trennfaktors ß mit der Kettenlänge und dem Verzweigungsgrad des N-Alkyl-Restes bei Substanzgruppe A ist nur bei 3-6 C-Atomen in der Alkylkette möglich, da bei den Verb. 1ab (R=Methyl) auf diese Weise keine Trennung gelang, und bei 2ab (R=Äthyl) das gepufferte LS 5 keine Vergleiche mit den anderen LS zuläßt.

1) Die Verteilungszahlen der racem-ÄDA (G_a) werden mit steigender Kettenlänge kleiner, mit Ausnahme von tert-But.ÄDA 8a.
2) Die Verteilungszahlen der meso-ÄDA (G_b) sind für Propyl und Isopropyl (3b, 4b) kleiner als für Butyl (5b), ändern sich aber beim Anstieg von 4 bis auf 6 C-Atome in der N-Alkylkette wie die G_a, was mit steigender Lipophilie erklärbar ist. (Ausnahme tert-But.ÄDA 8a)
3) Deshalb erreicht ß erst bei 4 C-Atomen sein Maximum (6ab) und fällt bis 6 C ab (2 N-Hexyl-Derivate lassen sich nicht mehr trennen (12ab, 15ab)).

In Bezug auf den Einfluß des Verzweigungsgrades, bei gleicher C-Zahl in der N-Alkyl-Kette, auf den Trennfaktor ß sind die Verhältnisse unübersichtlich (z.B. ß von tert-But.8ab < ß von n-Butyl 5ab < ß von 2-Methylpropyl 6ab).

Bei N-Alkyl-Resten mit 3-6 C-Atomen ist die Richtungsänderung der Verteilungsparameter G_a, G_b und ß nur aufgrund der Kettenlänge, nicht aber der Art der Verzweigung vorhersehbar.

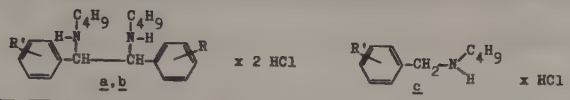
Tabelle 1 A: **Auftrennung der nach Syntheseweg a erhaltenen Reaktionsprodukte (diastereomere N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochloride und N-Alkyl-benzyl-amin-hydrochlorid) durch Craigverteilung (Stoffgruppe A)**



Verb.Nr.		R	LS*	n	V	G	ß	r_{max}	r_{min}	Ausbeuteverhältnisse		
										a : b : c** molar in %	a : b	(a+b): c***
1	a b	$-CH_3$	+)							30 : 40 : 19****	1 : 1,3	78 : 21
2	a b	$-CH_2-CH_3$	5	100	1	0,48 1,47	8	9 22	16	41 : 33 : 16	1 : 0,8	82 : 18
3	a b	$-CH_2-CH_2-CH_3$	1	24	1,6	0,25 4,54	19	5 20	10-14	31 : 40 : 14	1 : 1,3	84 : 16
4	a b	$-CH(CH_3)_2$	1	24	1,6	0,18 6,14	35	3 21	8-17	36 : 38 : 16	1 : 1,1	82 : 18
5	a b	$-CH_2(CH_2)_2-CH_3$	3	24	1,6	0,08 7,35	91	22 22	7-16	32 : 41 : 13	1 : 1,2	85 : 15
6	a b	$-CH_2-CH(CH_3)-CH_3$	4	24	1,45	0,02 6,15	302	0 21	5-14	40 : 42 : 8	1 : 1,0	92 8
7	a b	$-CH(CH_3)-CH_2-CH_3$	3	24	1,45	0,06 5,15	96	1 22	7-15	41 : 46 : 4	1 : 1,1	95 : 5
8	a b	$-C(CH_3)_3$	4	24	1,45	0,52 9,0	18	8 22	14	38 : 46 : 0	1 : 1,2	–
9	a b	$-CH_2(CH_2)_3-CH_3$	3	24	1,6	0,02 1,50	47	0 15	5-10	33 : 41 : 16	1 : 1,2	82 : 18
10	a b	$-CH_2-CH(CH_3)CH_2CH_3$	3	24	1,45	0,02 1,17	58	0 13	5- 7	43 : 41 : 8	1 : 1,0	91 : 9
11	a b	$-CH_2CH_2CH(CH_3)CH_3$	3	24	1,45	0,02 1,84	92	0 18	5-11	32 : 40 : 16	1 : 1,2	82 : 18
12	a b	$-CH_2(CH_2)_4-CH_3$	+)							66(ab):29		74 : 26
13	a b	$-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$	3	24	1,45	0,02 4,28	21	0 7	3	44 : 39 : 2	1 : 0,9	98 : 2
14	a b	$-CH(CH_3)C(CH_3)_3$	4	24	1,45	0,04 0,63	14	3 12	5	42 : 449: 0	1 : 1,0	–
15	a b	$-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$	+)							70(ab): 1		99 : 1
16	a b	$-(CH_2)_3CH(CH_3)_2$	4	24	1,45	0,02 0,28	13	0 5	3	39 : 26 : 20	1 : 0,7	77 : 23

Abkürzungen siehe Tab. 1 B

Tabelle 1 B : Auftrennung der nach Syntheseweg a erhaltenen Reaktionsprodukte (diastereomere N,N'-Dibutyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochloride und N-Butyl-benzyl-amin-hydrochlorid) durch Craigverteilung (Stoffgruppe B)



Verb.Nr.		R'	LS*	n	V	G	ß	r_{max}	r_{min}	Ausbeuteverhältnisse		
										a : b : c** (molar in %)	a : b	(a+b) : c***
17	a	2-CH_3	4	24	1,45	0,02	50	0	3- 6	31 : 29 : 37	1 : 0,9	62 : 38
	b					1,00		12				
18	a	3-CH_3	4	24	1,45	0,02	139	0	4-10	28 : 32 : 32	1 : 1,1	65 : 35
	b					2,84		18				
19	a	4-CH_3	4	24	1,45	0,02	68	0	4- 9	43 : 38 : 19	1 : 1,1	76 : 24
	b					1,38		14				
20	a	2-F	4	24	1,45	0,06	96	1	8-15	36 : 33 : 16	1 : 0,9	81 : 19
	b					6,15		21				
21	a	3-F	2	24	1,60	0,16	38	3	8-16	36 : 38 : 17	1 : 1,0	81 : 19
	b					6,14		21				
22	a	4-F	4	24	1,45	0,16	55	3	9-17	40 : 36 : 20	1 : 0,9	79 : 21
	b					8,99		22				
23	a	2-Cl	2	24	1,60	0,02	17	0	2	40 : 37 : 16	1 : 0,9	83 : 17
	b					0,35		6				
24	a	3-Cl	2	24	1,60	0,02	48	0	4- 6	32 : 32 : 27	1 :1,0	70 : 30
	b					1,00		12				
25	a	4-Cl	2	24	1,60	0,02	29	0	4	42 : 40 : 9	1 : 1,0	90 : 10
	b					0,62		9				
27	a	3-Br	4	24	1,45	0,02	68	0	4- 9	39 : 33 : 21	1 : 0,8	77 : 23
	b					1,38		14				
28	a	4-Br	4	24	1,45	0,02	41	0	5- 7	35 : 31 : 13	1 : 0,9	83 : 17
	b					0,86		11				
29	a	3-J	4	24	1,45	0,02	58	0	5- 7	-	-	-
	b					1,17		13				

Abkürzungen: a= racem-N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin(racem-ÄDA), b= meso-ÄDA, c= N-Alkyl-benzyl-amin, n= Zahl der Verteilungsschritte, V= Volumenverhältnis V_l/V_s, V_l= Volumen der leichten Phase, V_s= Volumen der schweren Phase, G= Verteilungszahl= KxV, K= Verteilungskoeffizient= C_l/C_s, C_s= Substanzkonzentration in der schweren Phase, C_l= Substanzkonzentration in der leichten Phase, ß= Trennfaktor, G_a/G_b, r_{max}= Lage des Maximums einer Verteilungskurve, r_{min}= Lage des Minimums einer Verteilungskurve

* Lösungsmittelsysteme LS:

LS 1	Chloroform/Methanol/2%ige HCl	2000 : 600 : 1400 Volumenteile(VT)
LS 2	Chloroform/Methanol/0,36%ige HCl	2000 : 200 : 1800 VT
LS 3	Chloroform/Methanol/3,6 %ige HCl	2000 : 200 : 1800 VT
LS 4	Chloroform/Ligroin/Methanol/3,2%ige HCl	1400:: 700 : 100 : 2000 VT
LS 5	Chloroform/Methanol/Phosphat-Citratpuffer(Mc.Ilvain) pH 5,5	2000 : 600 : 1400 VT

** c wurde durch Destillation abgetrennt

*** a + b + c = 100 Teile

**** Diastereomerenverhältnis wurde durch NMR-Spektroskopie ermittelt, da mit LS 1-5 keine Auftrennung möglich

+) mit LS 1-5 keine Auftrennung möglich

2) Der Einfluß des Ringsubstituenten auf das Verteilungsverhalten

Die Verteilung der Substanzklasse B wurde mit LS 4 (Tab. 1 B) durchgeführt (mit Ausnahme von 21ab, 23ab, 24ab, 25ab, die in LS 2 verteilt wurden). Es treten keine nennenswerten Unterschiede in den Verteilungszahlen G_a der Racemate auf. Der Trennfaktor ß ist somit hauptsächlich von G_b abhängig. Bei in 3-Stellung mit Methyl oder Chlor substituierten Verbindungen(18ab, 24ab) ist der Trennfaktor ß ungefähr doppelt so hoch wie bei in 2- oder 4-Stellung substituierten Isomeren. Die G_b der mit Fluor oder Brom ringsubstituierten Verbindungen sind auf Grund der unterschiedlichen Bedingungen(verschiedene LS bei 20ab-22ab, Reaktionsprodukt ist ein Vielkomponentengemisch bei 26ab) nicht vergleichbar: es lassen sich daher keine Aussagen über deren Substituenteneffekte auf ß machen.

III. Der Einfluß der Substituenten auf das molare Diastereomerenverhältnis und die Ausbeute an N-Alkyl-benzyl-aminen

Bei Stoffgruppe A schwankt das Diastereomerenverhältnis zwischen racem-und meso-ÄDA von 1:0,7 bis 1:1,3. Es ist keine Systematik in Bezug auf den N-Alkyl-Rest erkennbar.
Dagegen ist die Monomerenausbeute durch den Verzweigungsgrad des N-Alkyl-Restes beeinflußbar. Der tert-Butyl-Rest (8) verhindert die Monomerenbildung völlig(analog dem Befund von RAPPL (27)). Es scheint so zu sein, daß die Monomerenbildung durch 3 CH_3-Gruppen am C-1 der N-Alkyl-Kette am stärksten behindert wird (8), etwas weniger durch 1 CH_3 am C-1 (7, 13, 14, 15); (2 CH_3-Gruppen

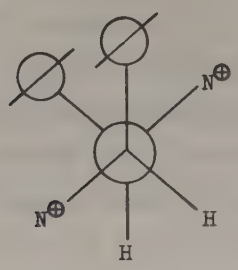
am C-1 liegen nur bei 4 vor, dessen Monomerenausbeute normal ist) 1 CH_3 am C-2 behindert ebenfalls noch die Monomerenausbeute(6, 10). Dagegen beeinflussen CH_3-Gruppen am C-3 oder C-4 längerer N-Alkyl-Ketten die Monomerenausbeute nicht mehr (11, 16).
Bei Stoffgruppe B schwankt das molare Diastereomerenverhältnis zwischen racem- und meso-ÄDA von 1:0,8 bis 1:1,1. Bei Halogen als Substituent scheint die Bildung der Racem-Form etwas begünstigt zu sein.
Zwischen der Monomerenausbeute und der Art und Stellung des Ringsubstituenten ist unter diesen Versuchsbedingungen keine Systematik erkennbar.

IV. Sterische Zuordnung der N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochloride

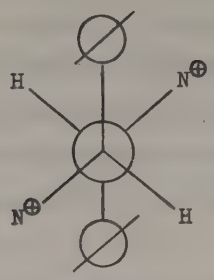
1) NMR-Daten

R.SCHÖNENBERGER et al. (28) konnten aufgrund der unterschiedlichen NMR-Spektren von diastereomeren ÄDAx2 HCl eindeutige konfigurative Zuordnungen treffen: im Vergleich zur Meso-Form sind die aromatischen Protonen der Racem-Form stärker abgeschirmt und damit diamagnetisch verschoben (Regel I), die α-H-Atome dagegen schwächer abgeschirmt und paramagnetisch verschoben (Regel II). Die Spektren von racem- und meso-N,N'-Dibutyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid(5a+5b) in D_4-Methanol zeigen in einem Temperaturbereich von -79 bis +38°C keine Veränderung der Bandenlage und -breite der für die Zuordnung entscheidenden aromatischen und α-ständigen Protonen. Daraus kann geschlossen werden, daß die

diastereomeren ÄDAx2HCl jeweils nur in einer Konformation vorliegen.



a=racem



b=meso

Diese Gesetzmäßigkeit erlaubt die Zuordnung diastereomerer ÄDAx2HCl durch Vergleich ihrer NMR-Spektren.

2) Verteilungskoeffizienten

Die aus den Verteilungszahlen von Abschnitt B.II. errechneten Verteilungskoeffizienten*) der ÄDAx2HCl sind bei den Racematen (lipophiler) immer kleiner als bei den entsprechenden Meso-Formen (Regel III).

3) hRF-Werte

Die mit dem essigsauren Fließmittel (FM 1, Tab.2 A) erhaltenen hRF-Werte weisen die Racemate als lipophiler aus und bestätigen die Ergebnisse der Craigverteilung, während im neutralen FM 2 immer die Meso-Formen die höheren hRF-Wertezeigen (Regel IV).

*)Der Verteilungskoeffizient ist hier abweichend von der üblichen Definition nach HECKER(29) definiert: $K=C_{leichte}/C_{schwere\ Phase}$, wobei die organische Phase die schwere ist.

4) Schmelzpunkte

Nach J.STERN et al.(30) zeigen bei Untersuchungen von Diastereomerenpaaren 90% aller Meso-Formen einen höheren Schmelzpunkt als die entsprechenden Racemate. Bei den hier untersuchten 26 ÄDAx2HCl-Diastereomerenpaaren haben ebenfalls fast 90% der Meso-Formen einen höheren Schmelzpunkt als die Racemate (23 von 26, Regel V).

5) Ergebnisse

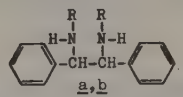
In den Tabellen 2 A und 2 B sind alle genannten physikalischen Eigenschaften aufgeführt. Anhand dieser Daten und der beschriebenen Regeln I-V lassen sich die getrennten Diastereomeren eindeutig konfigurativ zuordnen, bis auf folgende Ausnahmen (in den Tab. gekennzeichnet mit [a) b) c)]): 1ab, 12ab, 13ab, 14ab, 18ab, 19ab und 23ab.

Bei den beiden N-Hexyl-Derivaten 12ab, 13ab und den am Ring mit 3-Methyl substituierten Verb.18ab sind Regel II ($\tau\alpha$-H:a < b) und Regel V (Schmp. a < b) nicht erfüllt;hier ist keine endgültige Zuordnung mit der benutzten Methode möglich.

Bei den N-Hexyl-Verb.14ab und den 2-Chlor-ringsubstituierten Verb. 23ab sind alle Bedingungen bis auf Regel I erfüllt(τ arom.H: a > b); hier kann die getroffene Zuordnung nur als wahrscheinlich angesehen werden, genauso wie bei den 4-Methyl-ringsubstituierten Verb.19ab, die Regel II nicht erfüllen.

Bei den Methyl-Verb.1ab, bei denen Regel III (Verteilungskoeffizient $K_a < K_b$) nicht angewendet werden kann(keine Trennung durch Craigverteilung), ist eine eindeutige spektroskopische Zuordnung möglich.

Tabelle 2 A: Konfigurative Zuordnung diastereomerer N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochloride (Stoffgruppe A)

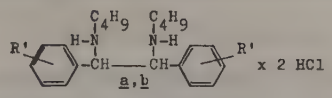


x 2 HCl

Verb.Nr.		R	K*	LS*	hRF** FL1	hRF** FL2	Schmp.	τ-Werte aromat.H	τ-Werte α-H	LM
1	a	$-CH_3$	+)		16	12	242°	2,3-2,8(m)	4,90(s)	D_2O
	b				00	26	304°	2,25(s)	4,97(s)	
2	a	$-CH_2CH_3$	0,11	5	28	16	205°	2,3-2,6(m)	4,70(s)	CD_3OD
	b		0,92		1	31	238°	2,0-2,7(m)	4,82(s)	
3	a	$-CH_2CH_2CH_3$	0,15	1	68	35	185°	2,0-2,9(m)	4,58(s)	CD_3OD
	b		2,84		22	59	215°	2,1-2,6(m)	4,74(s)	
4	a	$-CH(CH_3)_2$	0.11	1	50	41	241-5°	2,3-3,0(m)	4,53(s)	CD_3OD
	b		3,84		14	55	260°	2,1-2,6(m)	4,71(s)	
5	a	$-CH_2(CH_2)_2CH_3$	0,05	3	89	52	174-6°	2,76(m)	4,62(s)	CD_3OD
	b		4,58		53	72	217-8°	2,35(m)	4,76(s)	
6	a	$-CH_2CH(CH_3)_2$	0,01	4	90	79	202-3°	2,3-2,8(m)	4,47(s)	CD_3OD
	b		4,23		82	89	226-8°	2,0-2,5(m)	4,67(s)	
7	a	$-CH(CH_3)CH_2CH_3$	0,04	3	83	74	226-8°	2,1-2,9(m)	4,24(s)	CD_3COOD
	b		4,23		69	89	236-8°	1,8-2,6(m)	4,42(s)	
8	a	$-C(CH_3)_3$	0,35	4	49	61	218-9°	2,63(s)	4,26(s)	CD_3OD
	b		6,20		32	89	230-2°	2,52(s)	4,63(s)	
9	a	$-CH_2(CH_2)_3CH_3$	0,02	3	95	67	189-91°	2,58(s)	4,57(s)	CDOOD
	b		0,94		67	72	203-5°	1,8-2,6(m)	4,60(s)	
10	a	$-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$	0,01	3	93	67	178-82°	2,1-2,9(m)	4,40(s)	$CDCl_3$
	b		0,81		859	89	185-6°	2,46(s)	4,75(m)	
11	a	$-CH_2CH_2CH(CH_3)CH_3$	0,01	3	90	62	187-9°	2,3-2,9(m)	4,55(s)	CD_3COOD
	b		1,27		82	67	236-8°	1,9-2,6(m)	4,62(s)	
12	a	$-CH_2(CH_2)_4CH_3$	+)		93	65	142-3°	2,60(m)	5,0-5,2(m) 5,03(s) d)	$CDCl_3$ a)c)
	b				82	81	82°	2,50(m)	4,8-5,1(m) 4,90(s) d)	
13	a	$-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$	0.01	3	90	56	177-81°	2,4-2,9(m)	4,53;4,6(s)	CD_3COOD a)c)
	b		0,30		84	73	170-2°	1,7-2,6(m)	4,44(s)	
14	a	$-CH(CH_3)C(CH_3)_3$	0,03	4	85	88	188-90°	2,1-2,5(m)	4,5 (m)	$CDCl_3$ b)
	b		0,43		79	90	202-4°	1,7-3,7(m)	4,8 (m)	
15	a	$-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$	+)		92	80	178-80°			
	b				88	89				
16	a	$-CH_2(CH_2)_2CH(CH_3)_2$	0,01	4	929	67	170-5°	2,3-2,8(m)	4,67(s)	$CDCl_3$
	b		0,19		88	83	198-203°	2,0-2,5(m)	4,77(s)	

Abkürzungen siehe Tab. 2 B

Tabelle 2 B: Konfigurative Zuordnung diastereomerer N,N'-Dibutyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochloride (Stoffgruppe B)



Verb.Nr		R'	K*	LS*	hRF** FL1	hRF** FL2	Schmp.	τ-Werte aromat.H	τ-Werte α-H	LM
17	a	2-CH_3	0,01	4	93	41	181-3°	2,0-2,9(m)	4,30(s)	DCOOD
	b		0,69		90	72	187-8°	2,2-2,6(m)	4,52(s)	
18	a	3-CH_3	0,01	4	90	61	164-6°	2,6-2,9(m)	5,1-5,4(m)	$CDCl_3$ a)c)
	b		1,96		85	82	114-6°	2,3-2,8(m)	5,0 (m)	
19	a	4-CH_3	0,01	4	90	85	200-2°	2,6-2,9(m)	5,1 (m)	$CDCl_3$ c)
	b		0,95		86	86	210-12°	2,4-2,7(m)	4,9 (m)	
20	a	2-F	0,04	4	72	80	172-4°	2,1-3,1(m)	4,30(s)	CD_3OD
	b		4,24		62	86	176-8°	1,9-2,8(m)	4,53(s)	
21	a	3-F	0,10	2	89	63	178°	2,4-3,1(m)	4,60(s)	CD_3OD
	b		3,84		70	79	195°	2,0-2,7(m)	4,73(s)	
22	a	4-F	0,11	4	73	74	120-2°	1,8-2,8(m)	4,50(s)	CD_3OD
	b		6,20		69	88	208-9°	1,8-2,8(m)	4,70(s)	
23	a	2-Cl	0,01	2	81	62	175°	1,4-2,9(m)	4,31(s)	CD_3OD b)
	b		0,22		67	77	195°	1,7-2,8(m)	4,40(s)	
24	a	3-Cl	0,01	2	86	69	188-90°	2,2-2,5(m)	4,56(s)	CDOOD
	b		0,63		71	83	200°	1,9-2,3(m)	4,56(s)	
25	a	4-Cl	0,01	2	87	62	141-3°	2,0-2,6(m)	4,57(s)	CD_3OD
	b		0,3		79	81	219-21°	2,0-2,4(m)	4,70(s)	
27	a	3-Br	0,01	4	90	70	0 163°	2,1-2,8(m)	4,61(s)	D_6-DMSO
	b		0,95		77	83	175°	2,0-2,7(m)	4,7 (m)	
28	a	4-Br	0,01	4	77	82	140-3°	2,0-2,7(m)	4,66(s)	CD_3OD
	b		0,59		70	91	190-2°	2,2(m)	4,73(s)	
29	a	3-J	0,01	4	(85)	(66)	-	-	-	D_6-DMSO
	b		0,81		73	87	195°	1,8-2,8(m)	4,8 (m)	

Abkürzungen: a= Racem-Form, b= Meso-Form, FL= Fließmittel, LM= Lösungsmittel

* K= Verteilungskoeffizient in den Lösungsmittelsystemen LS 1-5 (Zusammensetzung siehe Tab.1 B)

** MERCK HF 254 Fertigplatten

FL1: Äthylacetat/Chloroform/Ligroin/Eisessig 50 : 15 : 20 : 30

FL2: Benzol/Methanol 90 : 10

+) mit LS 1-5 keine analytische Verteilung möglich

a) Ausnahme der Regel IV (Schmp. a < b)

b) Ausnahme der Regel I (τ aromat.H: a > b)

c) Ausnahme der Regel II (τ α-H: a < b)

d) nach D_2O-Austausch

C. PRÜFUNG AUF TUMORHEMMENDE WIRKUNG AM DMBA-INDUZIERTEN HORMONABHÄNGIGEN MAMMATUMOR DER SPRAGUE-DAWLEY-RATTE

I. Der DMBA-induzierte Mammatumor als Testmodell für die Bewertung mammatumorhemmender Verbindungen

1) Induktion von Mammatumoren

Beim Hund und bei der Maus treten spontan Mammatumoren auf, die im Gegensatz zu vielen menschlichen Mammatumoren nicht hormonabhängig sind. In seinem therapeutischen Verhalten dem menschlichen Mammacarcinom ähnlich erwies sich dagegen das Mammacarcinom der Ratte. Nach HUGGINS (31) lassen sich derartige hormonabhängige Mammatumoren bei weiblichen Ratten auf verschiedene Weise erzeugen:

1) durch Östrogene, mit geringen Tumorausbeuten, nach sehr langer Behandlungszeit,
2) durch ionisierende Strahlen, mit Tumorausbeuten zwischen 30 und 80%,
3) durch Gabe von aromatischen Kohlenwasserstoffen(KW);
   a) durch Hautpinselung mit 1,6%iger DMBA-Lösung: Ausbeute 73%(32)
   b) durch subkutane Applikation von verschiedenen KW: vereinzelt Mammatumoren(33),
   c) durch sechsmalige intravenöse Injektion einer Emulsion mit je 0,22mg DMBA in die Schwanzvene: Ausbeute 80%(34),
   d) durch dreimalige Injektion einer DMBA-haltigen Ö/W-Emulsion in die Schwanzvene: Ausbeute 100%(35),
   e) durch Verabreichung von 2-Acetylaminofluoren-haltigem Futter über mehrere Monate: Ausbeute gering(36),

f) durch Schlundsondenfütterung von je 2mg 3-Methylcholanthren über mehrere Monate an weibl. Wistar-Ratten: Ausbeute 80-90% (37)

g) durch einmalige Schlundsondenfütterung von 15-20mg DMBA, gelöst in Sesamöl, an 50 Tage alte weibl. Sprague-Dawley (SD)-Ratten: Ausbeute zwischen 75 und 100%, bei einer durchschnittlichen Induktionsdauer von 60-120 Tagen (38-43).

Die Ausbeute von hormonabhängiggen Mammatumoren ist von verschiedenen Vorausetzungen abhängig wie: Art und Dosis des aromat. KW, Art, Stamm, Alter und damit hormonellem Status der Tiere, infektionsfreier Tierhaltung und Vermeidung des Kontaktes mit krebsschützenden Substanzen (31). Für die Tumorinduktion mit DMBA (entweder 3x2mg i.v. oder 1x15mg oral) haben 50 Tage alte SD-Weibchen den idealen hormonellen Status und die empfindlichsten Mammazellen.

Es treten verschiedene Arten von Mammatumoren auf (43): in der Mehrzahl der Fälle schwierig zu klassifizierende, papillare Adenocarcinome, mit zum Teil ausgeprägter Sekretion, und daneben progressiv wachsende Fibroadenome; außerdem kommen manchmal Gehörgang-, Schweißdrüsen- und Speicheldrüsentumoren vor (40); sehr selten treten Lungenmetastasen auf (43).

Das Wachstumsverhalten der Tumoren ist unterschiedlich, auch am gleichen Tier. So wachsen z. B. während einer 12-wöchigen Beobachtungszeit 59% der Tumoren, 23% sind statisch und 18% gehen zurück, von denen die Hälfte in diesem Zeitraum völlig verschwindet; gleichzeitig entstehen ca. 8% neue Tumoren (40).

Es besteht die Möglichkeit der Transplantation dieses Tumors auf Inzuchtratten(44). In der dadurch erreichbaren, besseren Ansprechbarkeit auf Cytostaticabehandlung unterscheidet sich der transplantierte deutlich vom autochthonen Tumor. Dadurch wird aber die angestrebte Ähnlichkeit mit dem menschlichen Mammatumor geringer, wobei die Hormonabhängigkeit der Transplantate noch nicht geklärt zu sein scheint.
Für die Untersuchungen auf dem Gebiet der experimentellen Chemotherapie des hormonabhängigen Mammakrebses wird der DMBA-Tumor vorzugsweise benutzt.

2) Vorstellungen zur Carcinogenese

DMBA ist ein Procarcinogen, das in vivo vermutlich über eine Epoxidierung in 5,6-Position zum Carcinogen transformiert wird, und dann in der Lage ist, biologische Substrate zu alkylieren(45). Diese Giftung geschieht wahrscheinlich in der Mammazelle selbst(46), und hat deren Transformation zur latenten Tumorzelle zur Folge. Das epoxidierte DMBA und sich davon ableitende,in 5-Stellung z.B. mit Glutathion konjugierte Metaboliten,sind in der Rattenleber nachweisbar(47,48).

Die latente Tumorzelle wird unter der Stimulation von Östradiol, Somatotropin und Prolaktin wahrscheinlich irreversibel zum präneoplastischen Knötchen transformiert, wobei die Latenzzeit vom hormonellen Milieu abhängt. So kann Ovarektomie diesen Schritt unterbinden. Die gleichen Hormone bewirken die weitere Transformation zur hormonabhängigen Tumorzelle. Diese ist durch endokrine

Therapie beeinflußbar. Innerhalb von 120 Tagen nach der DMBA-Behandlung auftretende Tumoren sind zu 70-80% hormonabhängig(49,50, 51). Mit zunehmendem Alter und zunehmender Größe werden die Tumoren hormonunabhängig. Dieser Vorgang ist irreversibel.

3) Cytostaticatherapie und Zellcyclus

Alkylierende Cytostatica, Antimetaboliten und Antibiotica zeigen am DMBA-Tumor keine oder nur geringe Wirkung, analog den Befunden am menschlichen Mammatumor, der auf Chemotherapeutica ebenfalls schlecht anspricht. Eingehende zellcycluskinetische Untersuchungen am DMBA-induzierten Mammatumor(52) liefern die Erklärung für das Versagen einer solchen Therapie: Je nach Entwicklungsphase, in der sich die Tumorzelle im Augenblick befindet, variiert die Ansprechbarkeit gegenüber einer bestimmten krebshemmenden Verbindung.

In Abbildung 1 ist der Zellcyclus des hormonabhängigen Mammatumors der Ratte dargestellt, einschließlich der Angriffspunkte der Cytostaticatherapie. Die meisten Zellen (ca.90%) befinden sich in der Ruhephase (Kompartiment G_0). In diesem Zustand sind die Zellen gegen einen Angriff von alkylierenden Cytostatica relativ unempfindlich. Nur 10% der Zellen durchlaufen den Zellcyclus und stellen den Proliferationspool P_c dar. Aufgrund dieser niedrigen Wachstumsfraktion, die sich mit zunehmender Tumorgröße noch verkleinert, hat ein Antimetabolitenangriff, er findet in der S-Phase statt, nur geringen Effekt. Das Gleiche gilt für Colchicin, das auf Zellen in der M-Phase wirkt. Das Wachstumsverhalten des Tumors wird von der

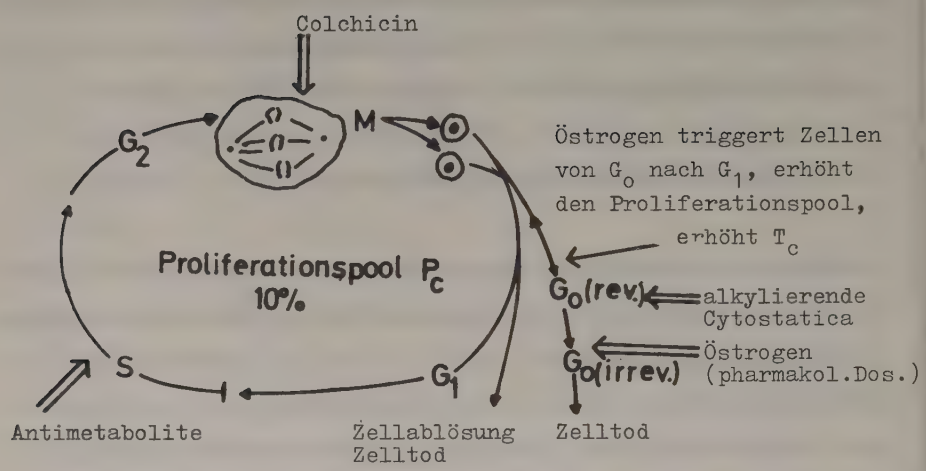


Abbildung 1: Zellcyclus des hormonabhängigen Mammatumors,
G_o= nichtproliferative-, G_1= postmitotische-,
S = DNA-Synthese- , G_2= prämitotische- ,
M = Mitose-Phase
T_c= Zellcycluszeit

Größe der Wachstumsfraktion beeinflußt. Die Zellcycluszeit T_c beträgt beim DMBA-Tumor 22 Stunden, die Verdopplungszeit des Tumorgewichts 9 Tage(bei Tumoren von 100-200mg Gewicht). Gleichzeitig spielt bei der Tumorentwicklung der laufende Zellverlust durch Zelltod oder Ablösung eine Rolle. Andere Mammatumoren haben erheblich kürzere T_c, z.B.das Adenocarcinom 755 der Maus eine T_c von 15 Stunden und eine Verdopplungszeit von einem halben Tag. Damit ist der DMBA-Tumor ein sehr langsam wachsender Tumor. Durch die Stimulierung mit Östrogenen läßt sich beim DMBA Tumor die Wachstumsfraktion erhöhen. Damit steigt die Empfindlichkeit gegen

cyclusspezifische Cytostatica an(43).
Die Östrogen-bedingte Wachstumsstimulierung ist von dem Vorhandensein eines Östradiol-spezifisch-bindenden Rezeptorproteins abhängig; sog."Targetgewebe"wie Uterus, Mamma, Hypophyse und Hypothalamus enthalten größere Mengen dieses Östrogenrezeptors, im Vergleich zum Normalgewebe. Auch in hormonabhängigen Mammatumoren kann sein Vorhandensein durch die erhöhte Aufnahme von markiertem Östradiol bewiesen werden(53). Man nimmt an, daß der Rezeptor in der Zellmembran oder im endoplasmatischen Reticulum lokalisiert ist. Seine Funktion besteht in der Komplexbildung mit Östradiol innerhalb der Zelle. Anschließend dringt dieser Komplex in den Zellkern ein und stimuliert die RNA-Synthese. Als Ursache wird eine Erhöhung der Chromatin-template-activity, der RNA-Polymerase-Aktivität und des RNA-Transports diskutiert(54,55). Nach Östradiolgabe kann man in zeitlicher Reihenfolge eine erhöhte RNA-, Protein- und DNA-Synthese feststellen. Dies ist aber nur bei hormonabhängigen Tumoren der Fall, da der Übergang zur Hormonunabhängigkeit mit einer Abnahme an Rezeptorprotein verbunden ist(56). Auch synthetische Östrogene, wie DES und HES, sind zur Rezeptorkomplexbildung befähigt. Antiöstrogene wie Nafoxidin, treten ebenfalls mit dem Rezeptor in Wechselwirkung und hemmen kompetitiv die Östradiolbindung(57). Durch die Wechselwirkung mit Östradiol wird Rezeptorprotein verbraucht; bei sehr hohen Östrogendosierungen verschwindet es ganz. Die gleichzeitige Hemmung des Tumorwachstums(35) steht in Widerspruch zu den vorstehenden Ausführungen. Hier werden stattdessen durch Milieuänderungen hervorgerufene, erhöhte Zellverlustraten, Veränderungen des Immunmechanismus und direkte metabolische Effekte der Östrogene als Wirkungsursache angenommen(58)(Siehe auch C.I.4)a).

Ob eine Verbesserung der Chemotherapie durch Verwendung von Verbindungen, bei denen eine cytotoxische mit einer östradiolrezeptoraffinen Komponente gekoppelt ist(Carrierprinzip, bessere Anreicherung im hormonabhängigen Mammatumor), erreicht werden kann, ist nicht abgesichert. Bei den bisher bearbeiteten Verbindungen vom Typ des Bis-ß-chloräthylamino-phenylessigsäure-östradiolesters zeigt das ungekoppelte Cytostaticum die gleiche Hemmwirkung(44,59), die gewünschte Anreicherung wurde nicht geprüft.

Eine andere Therapiemöglichkeit ist die alleinige Behandlung mit Antiöstrogenen, die das Wachstum durch eine optimale Erniedrigung der Wachstumsfraktion stoppt, und eine, durch den üblichen Zellverlust verursachte, Abnahme der Tumorgröße zur Folge hat(57).

4) Endokrine Therapie

a) Einfluß auf die hormonelle Wachstumsregulation

In Abbildung 2 sind die Vorstellungen über die Wachstumskontrolle des hormonabhängigen Mammatumors dargestellt. Das Tumorwachstum wird von den Ovarialhormonen Östradiol und Progesteron, und den Hypophysenvorderlappenhormonen Prolaktin (LTH= luteotropes Hormon) und Somatotropin (STH= Wachstumshormon) stimuliert.

Östrogene und Gestagene können auch in der Nebenniere produziert werden. Nebenniere und Ovar werden durch folgende Hypophysenvorderlappenhormone stimuliert: ACTH (Adenocorticotropes Hormon), LTH, ISCH (Zwischenzellen-stimulierendes Hormon) und FSH (Follikel-stimulierendes H.).

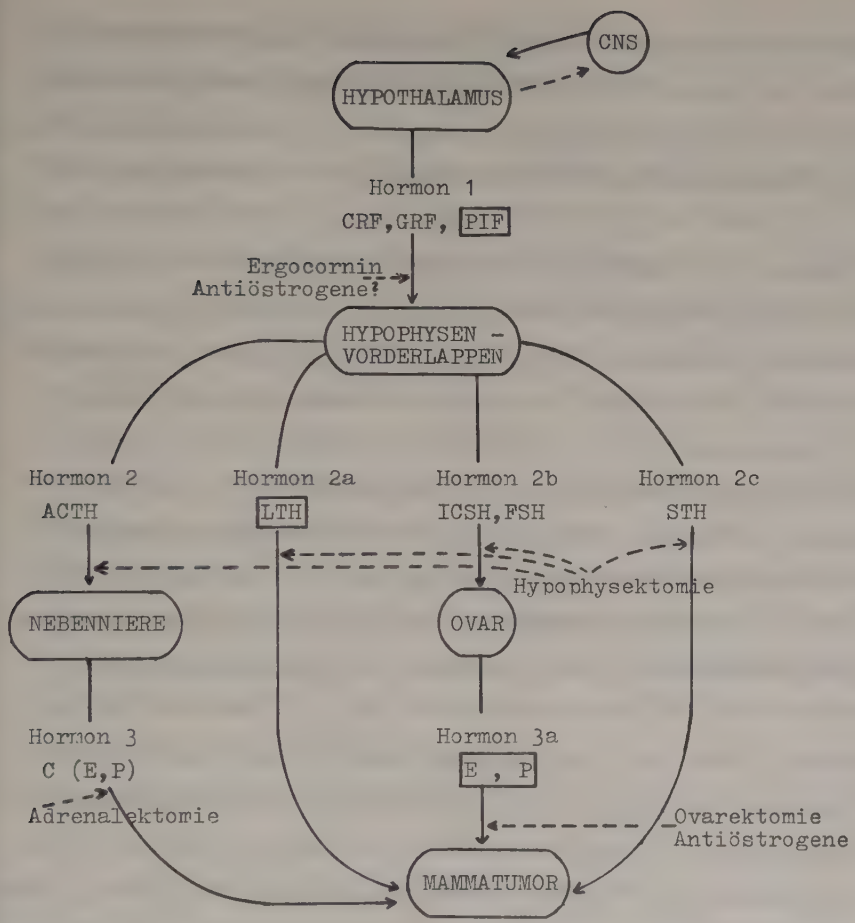


Abbildung 2: Endokrine Kontrolle der Entwicklung des hormonabhängigen Mammatumors

E = Östrogen, P = Prolaktin, C = Cortison

Die Hyophysentätigkeit wird vom Hypothalamus über die Releasing-Faktoren für Corticotropin(CRF) und Gonadotropin(GRF), und den Prolaktin-Inhibiting-Faktor(PIF) geregelt. Die Hypothalamusfunktion steht in Wechselwirkung mit dem zentralen Nervensystem (CNS).

Eine Hemmung der Mammatumorentwicklung ist auf der Ebene von Hormon 3/3a (Abb.2) möglich. Durch Ovarektomie werden die stimulierenden Hormone Östradiol und Progesteron entzogen(31,38). Durch Adrealektomie wird die zweite Östrogen- und Gestagen-produzierende Quelle ausgeschaltet. Der stimulierende Effekt der beiden Hormone kann auch durch Antiöstrogene beseitigt werden(44) . Die Antiöstrogene würden hier den Circulus vitiosus der Eigenstimulation unterbrechen. Gute Erfolge lassen sich durch Hypophysektomie erzielen(31,38). Durch diese Maßnahme wird die Funktion der Nebenniere und des Ovars, und die Produktion von Prolaktin ausgeschaltet.

Prolaktin(Hormon 2a) stimuliert das DMBA-Tumorwachstum(60). Eine Erniedrigung des Prolaktinspiegels führt zur Tumorwachstumshemmung. Wenn Östrogene fehlen(nach Ovarektomie),gehen die Tumoren trotz hoher Prolaktinspiegel zurück. Anderseits läßt sich das gestoppte Tumorwachstum bei hypophysektomierten Tieren mit niedrigen Prolaktinspiegeln durch Östrogenzufuhr nicht wieder hervorrufen.
Östrogene stimulieren die Prolaktinsynthese und -ausschüttung direkt über die Hypophyse und indirekt über die Unterdrückung der PIF-Ausschüttung im Hypothalamus(61). Ähnlich wirken Steroide wie Cortisol, Mestranol-norethynodrel u.a..Dagegen wird ein Antagonismus Östrogen/Prolaktin auf zellulärer Ebene in der Mammaazelle vermutet(62): bei hohen Östrogendosen erschöpfen sich die PIF-Speicher(63), und

die Tumoren gehen trotz hoher Prolaktinspiegel aufgrund der unphysiologischen Östrogenkonzentrationen zurück.

Auch Reserpin erhöht die Prolaktinausschüttung und fördert das Mammatumorwachstum(64). Allerdings wird hier ein Eingriff in ein übergeordnetes Zentrum der neurohumoralen Steuerung der Prolaktinsekretion diskutiert, das die PIF-Ausschüttung über Catecholamin-Transmitter regelt(65,66); Iproniazid und andere MAO-Hemmer antagonisieren den Reserpineffekt(63).

Eine Hemmung der Prolaktinausschüttung und des Tumorwachstums erfolgt durch Ergotalkaloide, wie Ergocornin, und durch α-Bromergokryptin(67). Das Antiöstrogen Nafoxidin senkt den Prolaktinspiegel während der Carcinogenese und verhindert die Tumorentstehung(68). Im Widerspruch dazu beeinträchtigen hohe Prolaktinspiegel ebenfalls die Carcinogenese(69). Die Veränderungen des Prolaktinspiegels wirken sich nur auf hormonabhängige Tumoren aus und haben großen Einfluß auf deren Wachstumsverhalten(70).

b) Beeinflussung von Stoffwechselprozessen

Nach dem molekularen Korrelationskonzept von WEBER(71) besteht ein meßbarer Zusammenhang zwischen dem fortschreitenden Grad der malignen Entartung und dem Ausmaß des metabolischen Ungleichgewichts in der Tumorzelle. Das kommt auf molekularer Ebene u.a. durch charakteristische Änderungen der Schlüsselenzymaktivitäten bei gegenläufigen Stoffwechselprozessen und durch Verschiebungen im Isoenzymmuster zum Ausdruck.

So ist bei Hepatomen z.B. die Glykolyse erhöht, die Glukoneogenese dagegen erniedrigt. Andere schnell wachsende Gewebe, wie regenerierende oder fetale Leber, zeigen nicht die Aktivitätsänderungen des Tumors(z.B.im Falle der Hexokinaseaktivität eine Erniedrigung anstelle der im Tumor beobachteten Erhöhung). Gleichzeitig nimmt bei Hepatomen der Gehalt an Isoenzymen mit niedrigen Michaelis-Konstanten mit steigender Malignität zu, an solchen mit hohen K_m ab. Die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ist erhöht. Diese durch Reprogrammierung der Genexpression bedingten,biochemischen Änderungen sind für die Tumorzelle von Vorteil: Prädominanz der Glycolyse als Voraussetzung des forcierten Wachstums (Korrelation von Wachstum und Glycolyse), erhöhte G-6-P-Dehydrogenase-aktivität als Voraussetzung einer gesteigerten Ribose- und NADPH-Synthese (Nucleinsäuresynthese), Verschiebung des Isoenzymmusters als Ursache einer verminderten Ansprechbarkeit auf regulatorische Signale anderer Zellen.

Im Gegensatz zu Hepatomen liegen bei Mammatumoren keine eingehenden Untersuchungen über die Anwendbarkeit des molekularen Korrelationskonzeptes vor. Verschiedene Angaben, wie zur Korrelation zwischen Wachstum und Glutaminaseaktivität bei transplantierten Nager-Mammatumoren(72), über vergleichende Untersuchungen zur Morphologie und Biochemie der Mamma und des DMBA-induzierten Mammacarcinoms der Ratte(73), sowie zum G-6-P-Dehydrogenase-Isoenzymmuster der Mäusemamma im präneoplastischen und neoplastischen Zustand(74), deuten jedoch auf gleichartige Verhältnisse wie bei Hepatomen hin.

Durch Ovarektomie werden beim DMBA-induzierten Mammatumor der Ratte die erhöhten Aktivitäten der glycolytischen Enzyme Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase reduziert(51,75). Dieser Vorgang ist mit einer Hemmung des Tumorwachstums verbunden, ein Hinweis für die Korrelation von Glycolyse und Wachstum im hormonabhängigen Mammatumor. Ferner wurde eine Senkung der G-6-P-Dehydrogenaseaktivität beobachtet. Sie kann auch nach der Applikation von Testosteronpropionat festgestellt werden(73) (Östrogen-antagonistische Wirkung? Östrogengaben erhöhen die G-6-P-Dehydrgenaseaktivität). Der DMBA-Tumor enthält zwei Isoenzymspecies, von denen nur eine nach Ovarektomie signifikant gesenkt wird(76). Das Verhältnis G-6-P-Dehydrogenase- zu α-Glycerophosphat-Dehydrogenaseaktivität, das sich mit steigender Malignität erhöht, nähert sich nach Ovarektomie dem Wert des normalen Brustgewebes(ca.4)(76). Das gilt auch für die Enzymaktivität von 5 sauren Hydrolasen, die vor und nach Ovarektomie im DMBA-Tumor bestimmt wurden(77). Durch Ovarektomie wird die Tumorzelle der normalen Mammazelle ähnlich.

II. Wahl des geeigneten Induktionsschemas

Für alle Versuchsserien wurden ca. 50 Tage alte weibliche Sprague-Dawley-Ratten amerikanischer Herkunft aus eigener Zucht verwendet. In einem Vorversuch (Serie 1) wurde den Tieren je 2mg DMBA als öllöslicher Anteil einer injizierbaren Öl-in-Wasser Emulsion am 50., 53. und 56. Lebenstag intravenös in die Schwanzvene verabreicht (Induktionsart II). Da nur bei 18% der Tiere behandlungsfähige Tumoren auftraten, gegenüber 100% nach HUGGINS(78), wurden während

der nächsten drei Versuchsserien folgende Induktionsarten vergleichend geprüft(Ergebnisse in Tab.13 u.14 im exp.Teil):

I Am 50.Tag nach der Geburt einmalige,orale Gabe von 20 bzw. 15mg DMBA, gelöst in 1ml Erdnußöl, verabreicht mit der Schlundsonde(35)
II wie oben beschrieben, dreimalige Gabe einer Ö/W-Emulsion i.v.,
III am 50., 53. und 56. Lebenstag je 2mg DMBA, gelöst in 0,05ml Dimethylsulfoxid(DMSO), intravenös in die Schwanzvene(79).

Die Ausbeuteangaben an behandlungsfähigen, tumortragenden Tieren, bezogen auf die überlebenden Tiere, lagen für die Induktionsart I bei 33, 24 und 22%, für InduktionsartII bei 18 und 34%, und schließlich für die dritte Induktionart bei 50%.
Aufgrund des einfacheren Herstellungsverfahrens für die DMSO-Lösung,ihrer Stabilität gegenüber der Emulsion, und der Kostenersparnis für das DMBA gegenüber dem oralen Induktionsverfahren I,entschieden wir uns bei den 6 nachfolgenden Versuchsserien für das Induktionsverfahren III.

Hier konnten wir bei einer Überlebensrate von 95% eine maximale Tumortierausbeute von 59% erzielen(Mittelwert 50,5%, Standardabweichung 7,3). Die Ausbeuteangaben in der Literatur liegen bei 100%, bezogen auf die überlebenden Tiere(79). Eine mögliche Erklärung dieser großen Ausbeutedifferenz sind eventuelle Veränderungen der endokrinen Eigenschaften des Rattenstammes während der bereits sechsjährigen Eigenzucht. Ähnliches berichten ENGELBART und GERICKE (80), die nach dreieinhalbjähriger Koloniezucht mit einmaliger,oraler Gabe von 20mg DMBA an SD-Ratten noch bei 62% der Tiere

Mammatumoren erzeugen konnten. TELLER et al.(40) erreichten eine Tumortierausbeute von 70% mit dieser Induktionsart.

III Vorversuche

1) Durchführung

Alle ÄDA von Abschnitt B.I. wurden mit den behandlungsfähigen Tumortieren der ersten 7 Versuchsserien nach folgendem Standardverfahren auf tumorhemmende Wirkung geprüft:
Da alle zwischen dem 50. und 120. Tag nach der DMBA-Behandlung auftretenden Tumoren im Bereich der Milchleiste nach TELLER(40) in der Mehrzahl hormonabhängig sind, bezeichneten wir die tumortragenden Tiere als behandlungsfähig, die mindestens einen oder mehrere, in diesem Zeitraum aufgetretene, Tumoren mit einer Mindestfläche von $100mm^2$ pro Tier aufwiesen.
Die Tumorfläche wurde näherungsweise als Produkt aus jeweils größtem und kleinstem Tumordurchmesser ermittelt, die mit einer modifizierten Schublehre gemessen wurden(39). Wegen der geringen Tumorausbeuten wurden für jede zu prüfende Substanz je 5 Tiere mit zusammen ungefähr gleicher Tumorfläche verwendet. Außerdem lief bei jeder Versuchsserie eine Kontrollgruppe mit. Wegen der besseren Vergleichbarkeit behandelten wir alle Versuchstiere nach dem gleichen Schema: Sie erhielten in der ersten Versuchswoche 3×10^{-3} Mol Substanz pro kg Ratte,im Abstand von 48 Stunden, subcutan in einer 0,5 molaren wässerigen Suspension.Nur bei Substanzen mit einer $DL_{50(1)} < 2000mg/kg$ wurde die Dosierung entsprechend erniedrigt(siehe Tab.3).

Die Gesamtversuchsdauer betrug je Gruppe 3 Wochen. Die Tiere wurden dreimal wöchentlich gewogen, die Tumoren genausooft gemessen. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter (Altromin R) und Trinkwasser.

Wahl eines geeigneten Suspensionsmittels

Nur einige kurzkettige ÄDAx2HCl (1ab, 2ab, 3ab) konnten aufgrund der gleichzeitig erhöhten Toxizität und damit niedrigeren Dosierung als wässerige Lösungen appliziert werden. Für alle anderen Verbindungen mußte ein geeignetes Suspensionsmittel gefunden werden. Nach(81) wird für das Screening von schwerlöslichen, krebshemmenden Substanzen eine 0,5% wässerige Carboximethylzellulose (Tylose C 2000)-Lösung empfohlen. Hier ist jedoch Unverträglichkeit zu erwarten, wegen der Reaktion des ionischen Suspensionsmittels mit den Hydrochloridsalzen der ÄDA. Das Gleiche gilt für das gebräuchliche Steroid-Suspensionsmedium "Diluent E" nach M.E.WALL et al.(44), das auch Carboximethylzellulose enthält. Wir untersuchten folgende Suspensionsmittel auf ihre Fähigkeit, mit den ÄDAx2HCl gleichmäßige, stabile Suspensionen zu ergeben:

I 0,6% Methylzellulose(MH 2000 HÖCHST) in 0,9%iger,wässeriger Natriumchloridlösung,

II 0,6% Methylzellulose MH 2000 und 0,5% Rizinolsäure-Polyäthylenglycolester(Cremophor EL,BASF) in 0,9%iger, wässeriger Natriumchloridlösung,

III 5% Polyvinylalkohol(Mowiol N 50-88 HÖCHST) in 0,9%iger, wässeriger Natriumchloridlösung,

IV 10% Polyvinylpyrrolidon(Kollidon 17 BASF) in 0,9%iger, wässeriger Natriumchloridlösung

V 50%ige wässerige Glucoselösung

Suspensionsmittel I ergab bei den meisten ÄDAx2HCl gut applizierbare Suspensionen. Einige Racemate waren unverträglich und konnten auch nicht mit der abgeänderten Zusammensetzung II suspendiert werden. Hier konnte erfolgreich Suspensionsmittel III angewendet werden. Die Rezeptur IV brachte keine Verbesserung gegenüber III, mit V ließen sich keine befriedigenden Suspensionen herstellen.

2) Auswertung

Es wurde von jeder Behandlungsgruppe der Mittelwert der Gesamttumorflächen der Einzeltiere am letzten Versuchstag mit dem entsprechenden Wert der Kontrollgruppe verglichen, indem der Quotient T/C (Mittelwert der behandelten/Mittelwert der Kontroll-Tiere) gebildet wurde(Siehe Tab.3).Außerdem wurden die Tumoren jeweils einer Behandlungsgruppe unabhängig vom Trägertier nach ihrem individuellen Wachstumsverhalten in vier Klassem eingeteilt:

a) Tumoren, die sich während der dreiwöchigen Behandlung völlig zurückbildeten, Abkürzung VR= völlige Rückbildung;
b) Tumoren, deren Fläche während des Versuches kleiner wurde oder keine Veränderung zeigte, Abk. TH= teilweise Hemmung;
c) alle Tumoren ohne offensichtliche Wachstumshemmung, Abk. KH= keine Hemmung;
d) alle Tumoren, die in dem Zeitraum vom 6.Versuchstag bis zum Versuchsende neu auftraten; diese Tumoren wurden ebenfalls in die Klassen a-c eingeteilt,Abk. NT= neue Tumoren.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Ergebnisse der Tumorhemmversuche der Versuchsserien(VS) 1-7 mit jeweils 5 Tieren ,die mit einer Dosis von 3 x10^{-3}Mol/kg Ratte behandelt wurden(s.c.)

VS	Verb.Nr.	T/C+	Tumor-Zahl(TZ) = 100%	Wirkung*							
				VR		TH		KH		NT	
				Zahl	%**	Zahl	%**	Zahl	%**	Zahl	%**
1	Kontr.1	-	6	-	-	-	-	6	100	1	16
	7a	0,65	5	-	-	-	-	5	100	-	-
	7b	0,39	5	-	-	4	80	1	20	-	-
	11a	0,51	7	-	-	1	14	6	86	2	28
	11b	0,45	6	-	-	3	50	3	50	1	16
2	Kontr.2	-	10	-	-	2	20	8	80	2	20
	6a	0,58	8	-	-	3	37	5	43	3	37
	6b	0,57	7	-	-	1	14	6	86	1	14
	8a	0,70	6	-	-	1	17	5	83	1	17
	8b	0,51	8	-	-	2	25	7	75	2	25
	10b	0,88	5	-	-	1	20	4	80	-	-
	13a	1,10	7	-	-	1	14	6	86	1	14
	16b	0,41	11	2	18	5	46	4	36	4	36
	18b	0,71	10	-	-	3	30	7	70	2	20
	19b	0,88	6	-	-	2	33	4	66	-	-
3	Kontr.3	-	9	1	11	2	22	6	66	-	-
	10a	1,29	9	-	-	3	33	6	66	1	11
	17b	1,49	8	-	-	4	50	4	50	1	12
	23b	1,46	5	-	-	1	20	4	80	-	-
4	Kontr.4	-	7	-	-	2	29	5	71	2	29
	16a	0,89	7	-	-	3	43	4	57	-	-
	20b	0,58	6	-	-	3	50	3	50	-	-
	21a	0,79	13	-	-	3	23	10	77	5	38
	21b	0,51	9	-	-	4	44	5	56	3	33
	22b	0,86	9	-	-	2	22	7	78	4	44
	23a	0,71	14	-	-	3	22	11	78	5	36
	24b	0,48	7	-	-	2	29	5	71	-	-
	25b	0,67	10	-	-	2	20	8	80	2	20
5	Kontr.5	-	10	-	-	1	1	9	90	4	40
	1b	0,67	9	-	-	3	33	6	67	2	22
	3b	0,87	10	-	-	4	40	6	60	2	20
	4b	1,06	14	-	-	3	21	11	79	5	36
	5a	0,68	10	-	-	5	50	5	50	2	20
	5b	0,82	12	-	-	5	42	7	58	5	42
	9a	1,09	8	-	-	2	25	6	75	2	25
	9b	1,09	13	-	-	3	23	10	77	3	23

Tabelle 3: Fortsetzung

VS	Verb.Nr.	T/C+	Tumor-Zahl(TZ) = 100%	Wirkung* VR Zahl	VR %**	TH Zahl	TH %**	KH Zahl	KH %**	NT Zahl	NT %**
5	14b	0,50	10	-	-	4	40	6	60	-	-
	18a	0,58	6	-	-	1	16	5	84	-	-
	19a	0,55	9	1	11	3	33	5	55	1	11
	17a	0,50	7	-	-	3	43	4	57	1	14
6	Kontr.6	-	11	-	-	-	-	11	100	5	45
	4a a)	0,66	12	-	-	4	33	8	67	2	17
	7b***	0,71	14	-	-	3	21	11	79	3	21
	12b	0,78	13	-	-	4	33	9	67	2	15
	13a	0,58	8	-	-	2	25	6	75	2	25
	27b	0,87	13	-	-	2	15	10	85	5	38
	28a	0,62	9	-	-	3	33	6	67	3	33
	28b	1,05	8	-	-	1	12	7	88	2	25
	23b***	0,50	7	-	-	3	43	4	57	-	-
	24a	0,83	13	-	-	7	54	6	46	7	54
7	Kontr.7	-	22****	-	-	2	9	20	91	6	27
	1a b)	1,13	16	1	6	2	13	13	81	7	44
	2b c)	0,91	9	-	-	3	33	6	67	1	11
	3a d)	1,60	21	-	-	2	10	19	90	13	62
	11b***	1,35	24	-	-	6	25	18	75	11	46
	12a	0,37	11	1	10	5	45	5	45	2	18
	15ab	1,76	19	-	-	-	-	19	100	12	63
	7a***	0,86	8	-	-	-	-	8	100	3	37
	17b***	1,65	11	-	-	4	36	7	64	3	27
	20a	1,07	9	-	-	1	11	8	89	2	22
	22a e)	0,91	13	-	-	3	23	10	77	4	31
	29b	0,93	13	-	-	2	15	11	85	4	38

\+ T/C= Gesamttumorfläche der Behandlungsgruppe/Gesamttumorfläche der Kontrolle am letzten Versuchstag

* Wirkung auf die Gesamtheit der Tumoren(TZ) jeder Behandlungsgruppe
VR= völlige Rückbildung des Tumors während des Versuches
TH= teilweise Hemmung, kein oder rückläufiges Flächenwachstum
KH= keine Wachstumshemmung
NT= neuaufgetretene Tumoren zwischen 6.Versuchstag und Versuchsende

** %-Anteil berechnet nach VR(bzw.TH, KH, NT)/TZ x 100 = %

*** Wiederholung des Vorversuches

**** Gruppenumfang 10 Tiere

a) Dosis 5 x 10^{-4}Mol/kg Ratte s.c. in der ersten Versuchswoche

b) Dosis 3 x 0,25 x 10^{-3}Mol/kg Ratte in der ersten Versuchswoche s.c.

c) Dosis 3 x 0,5 x 10^{-3}Mol/kg Ratte in der ersten Versuchswoche s.c.

d) Dosis 4 x ,25 x 10^{-3}Mol/kg Ratte in der ersten Versuchswoche s.c.

e) Normaldosis oral verabreicht

a) Statistische Bearbeitung der klassifizierten Tumorhäufigkeiten

Fragestellung: Das Verhältnis der gehemmten zu den nicht beeinflußten Tumoren im Vergleich zur Kontrolle gibt Auskunft über Substanzwirkungen; lassen sich diese Wirkungen statistisch absichern?

Dazu wurden die in Tabelle 3 aufgeführten klassifizierten Tumorhäufigkeiten innerhalb jeder Versuchsserie(mit mehr als 5 Behandlungsgruppen) einem Mehrfelder- χ^2-Test(kx2 Felder) nach BRAND-SNEDECOR (82) unterworfen. Es wurden in jeder Stichprobe(Behandlungsgruppe) die Häufigkeiten der beiden Klassen KH (keine Hemmung) und TH (teilweise Hemmung) als Alternativdaten verglichen, wobei die Werte der Klasse VR (völlige Rückbildung) wegen der geringen Besetzung zu den Häufigkeiten TH addiert wurden. Die Nullhypothese, alle Stichproben stammen aus der gleichen Grundgesamtheit mit dem gleichen Häufigkeitsverhältnis TH : KH, konnte bei keiner Versuchsserie abgelehnt werden. Unterschiede im Häufigkeitsverhältnis TH : KH zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen waren also statistisch nicht abzusichern.

b) Statistische Bearbeitung der mittleren Tumorzahlen am Versuchsbeginn und Versuchsende

Fragestellung: In Tabelle 4 sind für jede Versuchsserie die Mittelwerte der Tumorzahlen pro Behandlungsgruppe am Versuchsanfang aufgeführt; da während der ganzen Vorversuche bei der Gruppeneinteilung die jeweilige Gesamttumorfläche ungefähr konstant gehalten wurde, die mittlere Tumorzahl pro Gruppe aber von 5 bei Serie 1 bis auf 8,3

bei Serie 7 anstieg, ist es fraglich, ob dieser Anstieg rein zufällig ist. Die gleiche Frage stellt sich für die ansteigende Zahl der während des Versuchs neu auftretenden Tumoren, deren Mittelwerte ebenfalls in Tabelle 4 aufgeführt sind.

Tabelle 4: Mittelwerte der Tumorzahlen pro Behandlungsgruppe am Versuchsbeginn und Mittelwerte der Zahl der während des Versuchs pro Behandlungsgruppe neu auftretenden Tumoren der Versuchsserien 1-7

Versuchs-serie	n	$\frac{(\sum TZ-NT)^{*}}{n}$	$\frac{\sum NT^{**}}{n}$
1	5	5,0	0,8
2	10	6,2	1,6
3	4	7,3	0,5
4	9	6,8	2,3
5	11	7,7	2,6
6	9	7,9	2,7
7	12	8,3	5,4

n Zahl der Behandlungsgruppen jeder Versuchsserie

$\sum$ Summe über alle Behandlungen

* Mittelwert der Tumorzahlen am Versuchsbeginn

TZ= Tumorzahl am Versuchsende

NT= neu aufgetretene Tumoren

** Mittelwert der neu aufgetretenen Tumoren

Es ließ sich in beiden Fällen kein varianzanalytischer Vergleich der Mittelwerte durchführen, da der BARTLETT-Test(82) keine Varianzengleichheit ergab. Stattdessen wurde der von Varianzinhomogenität und Normalverteilung unabhängige H-Test nach KRUSKAL und WALLIS(82) durchgeführt, zum Vergleich mehrerer unabhängiger Stichproben aufgrund ihrer Rangsummen. Die Nullhypothese lautet: alle Stichproben stammen aus derselben Grundgesamtheit; sie konnte für beide Fragestellungen mit 95%iger Sicherheit verworfen werden.(Berechnung im Statistikteil)

Es wurde also angenommen, daß zwischen den einzelnen Versuchsserien 1-7 sowohl in Bezug auf Verteilung und Median der Tumorzahlen am Versuchsbeginn, als auch auf die Zahl der während der Versuche neu auftretenden Tumoren echte Unterschiede bestehen. Das Tumormodell hat sich im Laufe der Versuchsserien innerhalb einer Zeit von zweieinhalb Jahren in Bezug auf die Tumorhäufigkeit verändert.

3) Kritische Beurteilung

a) Tumormodell

Die Ergebnisse der Vorversuche können insgesamt als nicht ganz befriedigend angesehen werden. Neben der fehlenden statistischen Sicherheit der Tumorhemmwirkung fällt die mangelnde Reproduzierbarkeit bei teilweise durchgeführten Wiederholungen auf. So können z.B. von der 80%-Hemmung (TH) der Verbindung 7b in Versuchsserie 1 nur 21% in Serie 6 bestätigt werden. Verbindung 17b geht von 50% TH in Serie 3 auf 36% in Serie 7, Verb.11b von 50% in Serie 1 auf 25% in Serie 7 zurück. Bei Verb.23b steigt TH anderseits von 20% in Serie 3 auf 43% in Serie

Die Aussagekraft der Hemmwirkungen wird auch durch die unterschiedlichen mittleren Tumorzahlen pro Versuchsserie(Tab.4), jeweils zu Versuchsbeginn, beeinträchtigt. Das Gleiche gilt für die während des Versuches neu auftretenden Tumoren. Das Tumormodell ist während der Versuchsserien 1-7 nicht einheitlich.

b) Versuchsaufbau

Die Darreichungsform der ÄDAx2HCl als Suspensionen beinhaltet weitere Fehlerquellen. Bei der Applikation der Suspensionen werden s.c. Depots gesetzt. Die Wirkstoffresorption aus diesen Depots ist u.a. stark von den Partikelgrößen und deren statistischer Verteilung abhängig. Die Herstellung gleichmäßiger Präparate ist bei den ÄDAx2HCl aufgrund unterschiedlicher Kristallformen und elektrostatischer Aufladung beim manuellen Verreiben erschwert. Die bei manchen racem-ÄDAx 2HCl unerwartet auftretenden Unverträglichkeiten mit dem Suspensionsstabilisator Methylzellulose konnten zwar durch Ausweichen auf Polyvinylalkohollösungen umgangen werden, es war aber mit den angewandten Methoden keine Standardisierung der Suspensionen durchführbar.

Die unterschiedliche Löslichkeit der ÄDAx2HCl im wässerigen Suspensionsmittel bedingte zum Teil beträchtliche pH-Verschiebungen in den sauren Bereich (bis pH 3,5). Dadurch verursachte Hautreizungen nach subkutaner Applikation stellten einen weiteren Störfaktor dar.
Aus diesen Überlegungen ergibt sich, daß während der sich anschließenden, zweiwöchigen Beobachtungszeit wahrscheinlich mit keinen einheitlichen Gewebe- und Plasmakonzentrationen gerechnet werden konnte.

Da wir wegen der am Anfang besonders niedrigen Tumortierausbeuten die Versuchsgruppen nur mit 5 Tieren besetzten, konnten wir eine wichtige Voraussetzung für statistisch gut absicherbare Ergebnisse nicht erfüllen. In der sich anschließenden, eingehenderen Prüfung versuchten wir, diese Gesichtspunkte weitgehend zu berücksichtigen.

IV Eingehende Prüfung der N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamine auf tumorhemmende Wirkung unter Verwendung verschiedener Applikationsarten

1) Orale Applikation in Form von Futterpellets

a) Versuchsaufbau

Da wir in der siebten Versuchsserie eine Tumortierausbeute von 50% erzielen konnten (mit Induktionsart III, 3x2mg DMBA, gelöst in je 0,05ml DMSO), war es jetzt möglich, mit einem Gruppenumfang von 10 Tumortieren zu arbeiten, ohne das Substanzspektrum zusehr einschränken zu müssen. Die behandlungsfähigen Tiere wurden in Gruppen zu je 10, mit einer Gesamttumorfläche von ca. 2100mm^2, zusammengefaßt. Aus Platzgründen wurden die Zehnergruppen unter Randomisierung in je zwei Fünfergruppen aufgeteilt. Die Tiere erhielten 21 Tage lang das Testfutter und Wasser, die Kontrolltiere Placebopellets und Wasser ad libitum. Die aus Altromin R hergestellten Pellets enthielten die Substanzen in den in Tabelle 5 aufgeführten Konzentrationen.
Die Datenerfassung erfolgte nach dem üblichen Verfahren 3 x wöchentlich. Genauso oft wurde das Futter unter Rückwägung erneuert. Am 21.

Versuchstag wurden die Tiere getötet.

b) Auswertung

Während der Versuche stellten wir eine stark verminderte Futteraufnahme der Behandlungsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe fest. Damit gekoppelt waren starke Gewichtsverluste der Tiere und gehemmtes Tumorwachstum. Um Einflüsse des Gewichtsverlustes auf das Tumorwachstum erhärten zu können, setzten wir sofort eine zweite Kontrollgruppe zusammen, die ebenfalls mit Placebopellets gefüttert wurde. Diese Kontrolltiere erhielten aber nur soviel Futter, wie die Behandlungsgruppen dieser Oralversuche zum entsprechenden Zeitpunkt im Durchschnitt aufgenommen hatten. Wir erreichten damit Tumorhemmungen, die den Versuchsergebnissen mit den gefütterten ÄDAx2HCl 4a, 7a, 7b, 11a, 11b, 17a, 17b, 23a und 23b ähnlich waren.

c) Zusammenhänge zwischen Substanzkonzentration, Futteraufnahme, Körpergewicht und Tumorhemmung

Die Tumorflächen, Tiergewichtskurven und die Futteraufnahne sind am Beispiel des Verbindungspaares 7a und 7b im Vergleich mit der normal ernährten Kontrollgruppe 1 und der Kontrollgruppe 2 mit Futterrestriktion in Abbildung 3 und 4 dargestellt. Die Abszisse umfaßt jeweils die Versuchstage. Auf der Ordinate sind 3 Skalen mit der Tumorfläche in mm^2, der prozentualen Körpergewichtsänderung gegenüber dem Anfangsgewicht, und der Futteraufnahme pro kg Ratte aufgeführt. Alle Werte sind Mittelwerte der jeweiligen Gruppe. Es sind Zuammenhänge zwischen Futteraufnahme, Tiergewichtsänderung und Tumorflächen-

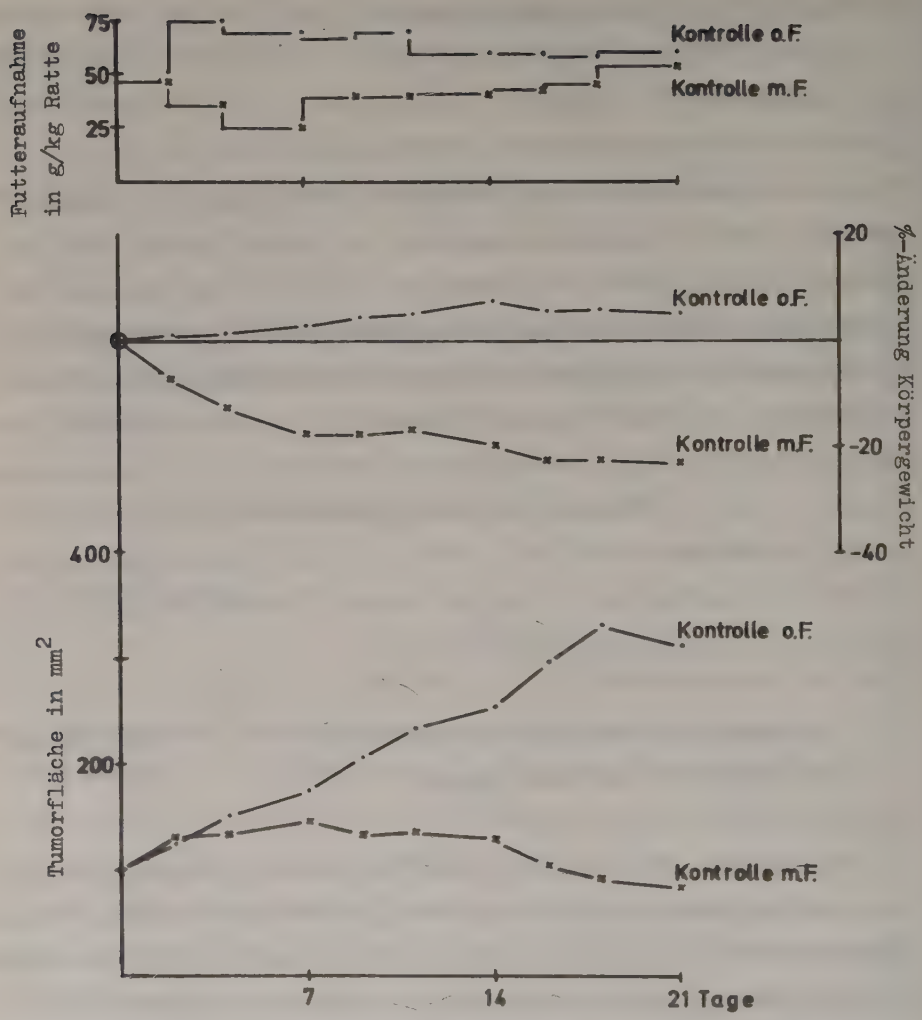


Abbildung 3: DMBA-induzierter Mammatumor der Ratte, Beeinflussung der Tumorfläche und des Körpergewichts durch Futtereinschränkung zum Vergleich mit Abbildung 4 (Verbindungen 7a + 7b)

m.F.= mit Futtereinschränkung

o.F.= ohne Futtereinschränkung

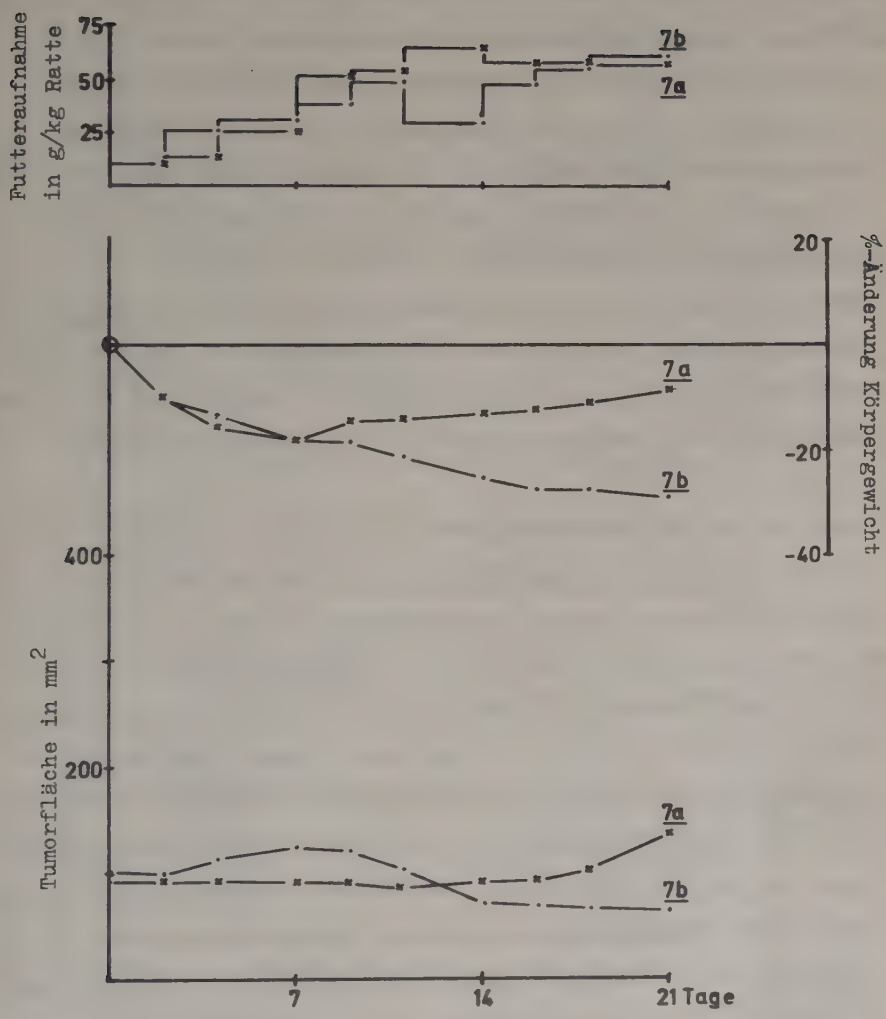


Abbildung 4: DMBA-induzierter Mammatumor der Ratte, Beeinflussung der Futteraufnahme, des Körpergewichts und der Tumorfläche nach oraler Appl. der Verb. 7a +7b im Futter im Vergleich zu Abbildung 3 (Kontrollen)

änderung erkennbar, wenn man den ungefähr parallelen Verlauf der zugehörigen Kurven betrachtet. Auf die graphische Darstellung der übrigen Versuchsgruppen wurde verzichtet, dafür sind die Substanzkonzentrationen im Futter, die Mittelwerte für die Futteraufnahme und Körpergewichtsabnahme während des Versuches, und für die prozentuale Veränderung der Tumorfläche gegenüber der Anfangsfläche jeder Behandlungsgruppe am Versuchsende in Tabelle 5 aufgeführt. Die Behandlungsgruppen sind nach abnehmender, durchschnittlicher Gewichtsänderung geordnet. Dadurch werden Zusammenhänge zwischen Substanzkonzentration im Futter, durchschnittlicher Futteraufnahme, Körpergewichtsänderung und Tumorflächenänderung leichter erkennbar.

Neben der zur Futteraufnahme parallel laufenden Tiergewichtsänderung und Änderung der Tumorfläche ist ein gewisser Einfluß der Substanzkonzentration auf die Futteraufnahme erkennbar. Zur Klärung der Frage nach echten tumorhemmenden Substanzwirkungen mußte der Einfluß der Körpergewichtsreduktion auf das Tumorwachstum genauer untersucht werden. Zur Beurteilung dieser Abhängigkeit wurde der SPEARMAN'sche Rang-Korrelationskoeffizient bestimmt(82)(Berechnung im statistischen Teil E.II). Wir erhielten einen auf dem 5%-Niveau signifikanten Wert für r_s, der besagt, daß zwischen Tiergewichtsreduktion und Tumorwachstum ein echter Zusammenhang besteht:
je stärker das Tiergewicht während der Behandlung zurückgeht, umso geringer ist das Tumorwachstum.

Hier stellte sich die Frage, ob bei dieser Tumorwachstumshemmung auch tumorspezifische Substanzwirkungen eine Rolle spielen. Folgende drei Gesichtspunkte weisen jedoch auf die ausschlaggebende

Tabelle 5: Ergebnisse der Fütterungsversuche

Verb.Nr.	Tier-zahl	Subst. konz. %	Futteraufnahme g/kg*	Futteraufnahme %*	Dosis mg/ Tag/kg	Tiergewichts-änderung %*	Tumorflächen-änderung %**
Kontr.1	10	Placebo	64	100	-	8,9	209
4a	10	0,02	61	95	12	-3,3	67
23a	9	0,21	44	69	103	-6,2	49
23b	10	0,21	50	78	93	-7,4	16
17b	10	0,38	35	55	102	-11,7	45
7a	10	0,36	44	69	139	-13,1	50
11b	10	0,38	44	69	118	-14,1	-3
11a	10	0,38	47	73	181	-14,7	-42
Kontr.2***	10	Placebo	42	65	-	-17,7	-29
17a	10	0,38	34	52	131	-21,0	-35
7b	9	0,36	38	59	161	-21,3	-38

* Mittelwert aller Versuchstage

** Mittelwert aller Tiere am 21.Tag

*** Kontrolle mit Futtereinschränkung

Wirkung der Tiergewichtsreduktion hin:

1) Durch die anschließenden Versuche mit den gleichen Substanzen, aber anderen Applikationsarten, konnten keine tumorhemmenden Wirkungen bei Vermeidung von Körpergewichtsverlusten erzielt werden, mit Ausnahme von Verb. 11a.
2) Mit 11a erreichten wir im vorstehenden Versuch die stärkste Tumorhemmwirkung überhaupt, aber nicht die maximale Körpergewichtsreduktion.
3) Die durch das verminderte Futterangebot bei Kontrolle 2 bewirkte Körpergewichtsreduktion hatte eine Tumorwachstumshemmung zur Folge, die im erwarteten Bereich lag.

GRISWOLD et al.(38) haben beim gleichen Versuchsmodell ebenfalls eine starke Abhängigkeit des Tumorwachstums von der Körpergewichtsreduktion festgestellt.

2) Orale Applikation in Form von Milchemulsion

a) Versuchsaufbau

Mit dieser Applikationart versuchten wir die Nachteile der subkutanen Emulsionsapplikation und die durch Geschmacksbeeinträchtigung verursachten Gewichtsverluste der Tiere bei den Fütterungsversuchen zu umgehen.
Die Tiere wurden in Bezug auf Tumorinduktion, Gruppeneinteilung und Datenerfassung wie in den vorhergehenden Versuchen behandelt.

Sie erhielten Altromin R während des ganzen Versuches, und statt Wasser wurde ihnen eine die in Erdnußöl gelösten ÄDA-Basen enthaltende Milch, in einer Menge von maximal 50ml pro Tag und Tier, 3 Wochen lang, angeboten(Herstellung im exp.Teil D II). Nach dem 21. Versuchstag wurden die meisten Tiere getötet, ein Teil für weitere Untersuchungen ovarektomiert.

b) Auswertung

Die Ergebnisse in Form von klassifizierten Tumorhäufigkeiten(analog Abschnitt C.III.2)a) sind in Tabelle 6 aufgeführt.Es gelten die gleichen Klassen wie in Tabelle 3, alle Tumoren einer Behandlungsgruppe (TZ) sind nach Häufigkeiten und Prozentanteilen aufgeteilt unter: VR= völlige Rückbildung, TH= teilweise Hemmung, KH= keine Hemmung und NT= neu aufgetretene Tumoren. Zusätzlich sind die Mittelwerte der Tumorflächenänderung in Prozent der Anfangsfläche angegeben. Nur die mit Verb.11a (R= 3-methylbutyl) behandelte Gruppe weicht von den übrigen Gruppen und der Kontrollgruppe stärker ab. Das Verhältnis der gehemmten zu den nicht beeinflußten Tumoren im Vergleich zur Kontrolle gibt Auskunft über eine Substanzwirkung.

Fragestellung: Ist das abweichende Tumorhäufigkeitsverhältnis bei der Behandlungsgruppe 11a nur zufällig, oder liegt eine echte Abweichung vor?

Zur Beantwortung dieser Frage dient der kx2-Felder-x^2-Test nach BRAND-SNEDECOR (82), der mehrere Stichproben auf Homogenitätprüft. Es werden die Tumorhäufigkeiten TH:KH verglichen, wobei Tumoren der

Tabelle 6: Ergebnisse der Versuche mit Milchemulsion

Verb.Nr.	Tier-zahl	Dosis mg/ Tag/kg	Tumor-zahl(TZ) = 100%	Wirkung*								Tumorflä-chenänd. %
				VR		TH		KH		NT		
				Zahl	%**	Zahl	%**	Zahl	%**	Zahl	%**	
Kontr.	10	-	20	-	-	3	15	17	85	2	10	178
7a	10	24	30	-	-	10	33	20	66	12	40	127
7b	10	46	26	-	-	3	12	23	88	9	35	204
11a	10	49	32	1	3	18	56+	13	41	7	21	47
11b	10	49	20	-	-	5	25	15	75	9	56	110
12a	10	26	22	-	-	6	27	16	73	5	32	158
12b	5	52	12	-	-	4	33	8	66	5	42	104
17a	10	14	15	-	-	4	27	11	63	2	13	131
17b	10	49	23	1	4	3	13	19	83	7	30	160
23a	10	50	27	1	4	3	11	23	85	11	41	178
24b	10	98	18	-	-	7	39	11	61	5	28	106

* siehe Tabelle 3

** siehe Tabelle 3

\+ signifikant($p < 0{,}05$)

Klasse VR zur Klasse TH addiert werden(die Klassenbesetzung VR ist zu gering, um einen differenzierenden Test durchzuführen).

Das Ergebnis des Tests lautet: es bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen. Da das Tumorhäufigkeitsverhältnis von Behandlungsgruppe 11a von den übrigen Gruppen stark abweicht, wird der kx2-Felder-Test ohne 11a wiederholt. Der zweite Test besagt, daß die übrigen Gruppen in Bezug auf das Tumorhäufigkeitsverhältnis TH:KH homogen sind(Berechnung im Statistik-Teil E.III.).

Interpretation: Der im ersten Test erzielte, signifikante χ^2-Wert ist allein auf das abweichende Tumorhäufigkeitsverhältnis von 11a zurückzuführen, d.h., Verb.11a zeigt unter diesen Versuchsbedingungen und dieser Auswertungsmethode eine signifikante, tumorhemmende Wirkung.

Gleichzeitig wird der H-Test nach KRUSKAL und WALLIS(82) zum Vergleich mehrerer unabhängiger Stichproben aufgrund ihrer Rangsummen durchgeführt. Die Stichproben bestehen aus den Behandlungsgruppen, wobei als Variable die prozentualen Tumorflächenänderungen der Tiere jeder Behandlungsgruppe miteinander verglichen werden. Die Mittelwerte der Tumorflächenänderungen sind in Tabelle 6 angegeben. Auf diese Weise wird ein anderes Versuchskriterium zum Vergleich herangezogen: der auch hier vorhandene Unterschied zwischen 11a und den übrigen Gruppen ist allerdings nicht signifikant.

3) Applikation durch intraperitoneale Injektion, orale Verabreichung mit der Schlundsonde und Verfütterung in Form von Mikrokapseln

Aus den bisherigen Versuchen ergeben sich folgende vorrangige Fragen:

1) Läßt sich die im Vorversuch (Tabelle 3, VS 5) angedeutete tumorhemmende Wirkung von Verb. 5a (racem-N,N'-Dibutyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin) und 14b (meso-N,N'-Di-1,2,2,-trimethylpropyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin) mit einer sicheren Applikationart bestätigen?

2) Vorbemerkung: die Verbindungen 23a und 23b(racem- und meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(2-chlorphenyl)-äthylendiamin) und 7b (meso-N,N'-Di-sek-butyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin) zeigten genauso wie die Verbindungen 5a und 14b bei unabhängigen Versuchen am Benzidin-induzierten Mammatumor der Ratte, die von STEINHOFF*) an weibl. SD-Ratten durchgeführt wurden, eine tumorwachstumsverzögernde Wirkung (Ergebnisse in Tabelle 10A+B). Diese Verbindungen wurden von uns bereits mehrfach geprüft, die Ergebnisse waren aber unbefriedigend.

   Frage: Läßt sich durch die Testung dieser Verbindungen mit weiteren Applikationsarten das Vorhandensein einer Hemmwirkung am DMBA-Tumor endgültig klären?

*) Für die Überlassung der Versuchsergebnisse sind wir Herrn Dr.DIETER STEINHOFF, Abteilung für Toxikologie der Farbenfabriken Bayer, zu großem Dank verpflichtet.

a) Versuchsaufbau

Zu Frage 1: Wegen der Nachteile der bisher angewandten Applikationsarten führten wir die ÄDAx2HCl 5a und 14b in die öligen Basen über, lösten sie zu 10% in Olivenöl und verabreichten sie unter den üblichen Versuchsbedingungen 3 Wochen lang intraperitoneal(Dosierung in Tabelle 7a). Die Versuchstiere standen anschließend noch 3 Wochen unter Beobachtung.

Zu Frage 2: Um die Futterverweigerung aufgrund des empfindlichen Geschmacksinns der Ratten zu umgehen, oder um eine appetitzügelnde Wirkung der Verbindungen zu beweisen(Abschnitt C.IV.1)c), stellte Herr EGGINGER*) aus den Verbindungen 23a und 23b Mikrokapseln her, die mit Altromin R zu Pellets verpreßt wurden. Die in Zehnergruppen zusammengefaßten Versuchstiere wurden 3 Wochen lang damit gefüttert, die Kontrollgruppe erhielt Placebopellets. Anschließend standen die Tiere noch 3 Wochen unter Beobachtung und erhielten Normalfutter.
Die anderen Substanzen mit unsicherer Wirkung und die noch nicht geprüfte Verb.25a(racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4-chlorphenyl)-äthylendiamin) applizierten wir i.p. als in Öl gelöste Basen(Dosierung in Tabelle 7a). Der Versuchsaufbau folgte dem üblichen Schema.
Als positive Kontrollen dienten zwei Versuchstiergruppen, die 3 Wochen lang mit Diäthylstilböstrol (in Suspensionsmittel I, Seite 34) behandelt wurden, in Dosierungen von 5 x wöchentlich 1,9(DES I) bzw. 0,6mg/kg(DES II) s.c.; anschließend folgte dreiwöchige Beobachtung.

*) Für die Unterstützung bei der Herstellung der Mikrokapseln sind wir Frau Prof. Dr. E. ULLMANN, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie d.Universität München, zu Dank verpflichtet.

b) Auswertung

Zur Auswertung der Ergebnisse werden zwei Variable herangezogen:

α) die Zahl der Tumoren mit gehemmtem Wachstum von jeder Behandlung,

ß) die prozentualen Tumorflächenänderungen der Tiere jeder Behandlung.

Nach jeder Auswertung wird versucht, die beiden gestellten Fragen zu beantworten.

α) Auswertung der klassifizierten Tumorhäufigkeiten mit kx2-Felder-Tafeln

In den Tabellen 7a und 7b sind die Ergebnisse der Tumorhemmung aller Behandlungen nach 3 und 6 Wochen aufgeführt. Es ist neben der Zahl und dem Prozentanteil der Tumoren, die kein Wachstum zeigen(TH), zum Vergleich die prozentuale Tumorflächenänderung gegenüber der Anfangsfläche der Tiere jeder Behandlung angegeben.

Die Tabellenwerte sind absteigend nach dem Prozentanteil TH (teilweise Hemmung) an der Gesamttumorzahl(TZ) pro Versuchsgruppe(= Behandlung) angeordnet.

Wie unter Abschnitt C.III.2)a) (S.40) werden die Tumorhäufigkeitsverhältnisse aller Behandlungen mit einem kx2-Felder-Test auf Homogenität geprüft. Dabei stellt sich heraus, daß die Häufigkeitsverhältnisse zu beiden Versuchszeitpunkten inhomogen($p<0,05$)sind.Um die Inhomogenität zu lokalisieren, wird der Test erweitert, indem zusätzlich eine Zerlegung der Freiheitsgrade und der Gesamtvariation erfolgt. Dabei wird geprüft, ob nach 3 Wochen Versuchsdauer die Behandlungen 1-5 (mit den Verb. DES I, DES II, 5a, 14b und 25a, = Gruppe I,

Tabelle 7a) homogene Tumorhäufigkeitsverhältnisse haben, gegenüber den anderen Behandlungen einschließlich der Kontrollen(= Gruppe II). Nach 6 Wochen (Tab. 7b) erfolgt die Prüfung für Behandlung 1+2 (Gruppe I) und 3-11 (Gruppe II).

Tabelle 7a: Ergebnisse der Tumorhemmversuche mit verschiedenen Applikationsarten nach 3 Wochen Versuchsdauer

Nr.	Verb. Nr.	Appl.	Tier-zahl	Gesamt-dosis Mol/kg	Tumor-zahl TZ	davon TH^+ =	%	Tumorflächen-änderung %
1	DES I	s.c.	10	17,1mg	13	6	54	25
2	DES II	s.c.	10	5,4mg	18	9	50	73
3	5a	i.p.	10	3×10^{-3}	29	14	48	138
4	14b	i.p.	10	3×10^{-3}	21	10	48	64
5	25a	i.p.	10	3×10^{-3}	31	13	42	78
6	Placeb.	oral	10	-	25	8	32	171
7	23a	oral*	10	3×10^{-3}	17	5	29	178
8	7b	i.p.	15	$1,17 \times 10^{-3}$	22	6	27	130
9	23a	oral**	15	$1,67 \times 10^{-3}$	33	8	24	188
10	Kontr.	i.p.	10	-	25	6	24	209
11	23b	i.p.	10	3×10^{-3}	26	6	23	254
12	23b I	oral*	9	$1,5 \times 10^{-3}$	23	5	22	142
13	23b II	oral*	10	3×10^{-3}	28	3	11	233

* Fütterung mit mikroverkapselten Substanzen

** Fütterung mit der Schlundsonde

\+ alle Tumoren, die kein Wachstum zeigen =teilweise Hemmung

Tabelle 7b:: Ergebnisse der Tumorhemmversuche mit verschiedenen Applikationarten nach 6 Wochen Versuchsdauer

Nr.	Verb.Nr.	Tumorzahl TZ	davon TH+	= %	Tumorflächen-änderung %
1	DES I	13	8	62	185
2	5a	36	19	53	264
3	14b	32	10	31	343
4	23a*	21	6	29	489
5	23b* II	31	9	29	489
6	25a	42	12	29	316
7	DES II	25	7	28	222
8	23b	34	8	24	584
9	Placebo	37	8	22	442
10	Kontr.	27	5	19	429
11	23b* I	32	5	16	260

* siehe Tab. 7a

\+ siehe Tab. 7a

Ergebnis: Nach 3 und 6 Wochen bestehen zwischen den Behandlungen innerhalb Gruppe I und innerhalb Gruppe II keine Unterschiede in den Tumorhäufigkeitsverhältnissen; die Inhomogenität besteht zwischen den Gruppen, sowohl nach 3, als auch nach 6 Wochen.

Antwort auf Frage 1:

Nach 3 Wochen Behandlung haben die beiden Substanzen 5a und 14b eine erhöhte Zahl von Tumoren mit verzögertem Wachstum gegenüber der Kontrolle. Nach 6 Wochen ist nur noch bei Substanz 5a die Zahl der Tumoren der Klasse TH erhöht. Beide Substanzen haben eine schwache, tumorwachstumshemmende Wirkung, die ungefähr der von DES in der niedrigen Dosierung entspricht(DES II).

Antwort auf Frage 2:

Die Testung der angeführten Verbindungen mit weiteren Applikationsarten führt zu keiner Tumorhemmung, denn die Auswertung der Variablen "Prozentanteil der Tumoren mit gehemmtem Wachstum an der Gesamttumorzahl" zeigt, daß aufgrund der Homogenität der Prozentanteile keine Unterschiede zur jeweiligen Kontrollgruppe bestehen.
Nur die zusätzlich geprüfte Verbindung 25a hat nach 3 Wochen Versuchsdauer eine im Bereich von DES II liegende, tumorhemmende Wirkung, die aber durch eine gleichzeitig aufgetretene Körpergewichtsreduktion von durchschnittlich 4% beeinträchtigt wird, gegenüber einer Körpergewichtszunahme der Kontrolltiere um 2%. Nach Abschnitt C.IV.1)c) ist bei einer Körpergewichtsreduktion in diesem Bereich ein Einfluß auf das Tumorwachstum zu erwarten.

ß) Auswertung der Tumorflächenänderung mit Hilfe der Varianzanalyse

In den Abbildungen 5, 6 und 7 sind alle Mittelwerte aus den Tumorflächenquotienten $\left[\left(\frac{\text{gemessene Fläche}}{\text{Anfangsfläche}} - 1\right) \times 100\right]$ dieser Versuchserie dargestellt. Auf der Abszisse sind die Versuchstage, auf der Ordinate die Flächenquotienten in Prozent eingezeichnet. Außerdem befindet sich am oberen Abbildungsende eine zweite Ordinatenskala mit der durchschnittlichen, prozentualen Gewichtsänderung der Tiere jeder Behandlungsgruppe. Die Abszisse gibt wiederum die Versuchstage an. Die alleinige Darstellungsart der Tumorflächenmessungen als mittlere Verlaufskurven jeder Behandlung läßt einen großen Teil des Informationsgehaltes der Einzelverlaufskurven ungenutzt. Die nach dem üblichen Verfahren gewonnenen Daten der Tumorflächenmessung stellen für jedes Versuchstier eine individuelle Zeitreihe dar, mit unterschiedlichen Reaktionswerten auf die Behandlung. Wir wollen versuchen, Unterschiede zwischen den Reaktionsverläufen bei der Behandlung mit verschiedenen Verbindungen herauszufinden. Die bei den Tumorhemmversuchen vorliegenden, empirischen, nicht linearen Reaktionsverlaufskurven lassen sich unter Erfüllung bestimmter Voraussetzungen mit Hilfe der Varianzanalyse auf unterschiedliche Verläufe und Parallelverschiebung prüfen(83, 84-86).

Die Voraussetzungen der Varianzanalyse von Zeit-Wirkungskurven sind: a) angenähert normalverteilte Daten und b) Gleichheit der Fehlervarianzen zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Abhängigkeit der Daten von unterschiedlichen Tumorflächen zu Versuchsbeginn umgingen wir zum Teil durch die oben angeführte Quotientenbildung. Die als Quotienten

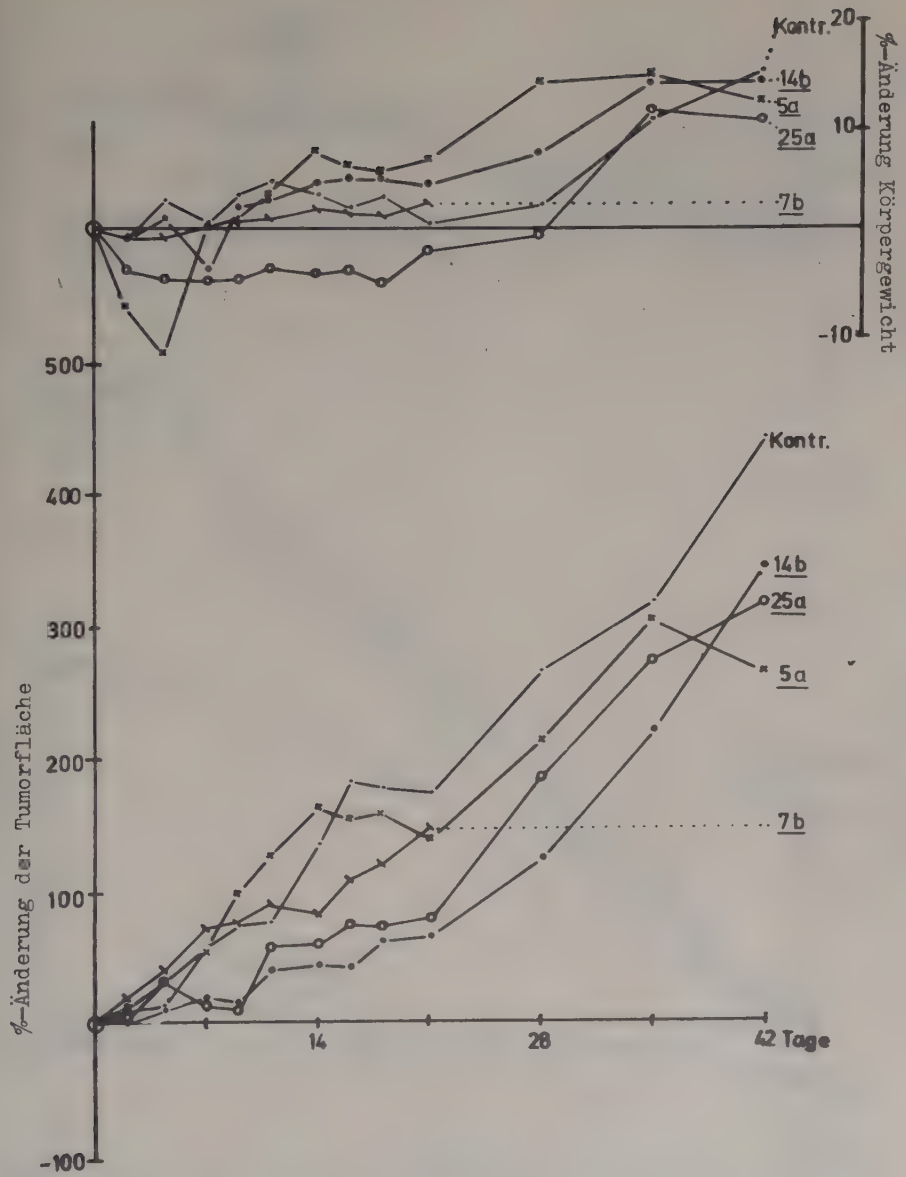


Abbildung 5: DMBA-induzierter Mammatumor der Ratte, Beeinflussung der Tumorfläche und des Körpergewichts nach Behandlung mit 5a, 14b, 25a und 7b im Vergleich zur Kontrolle

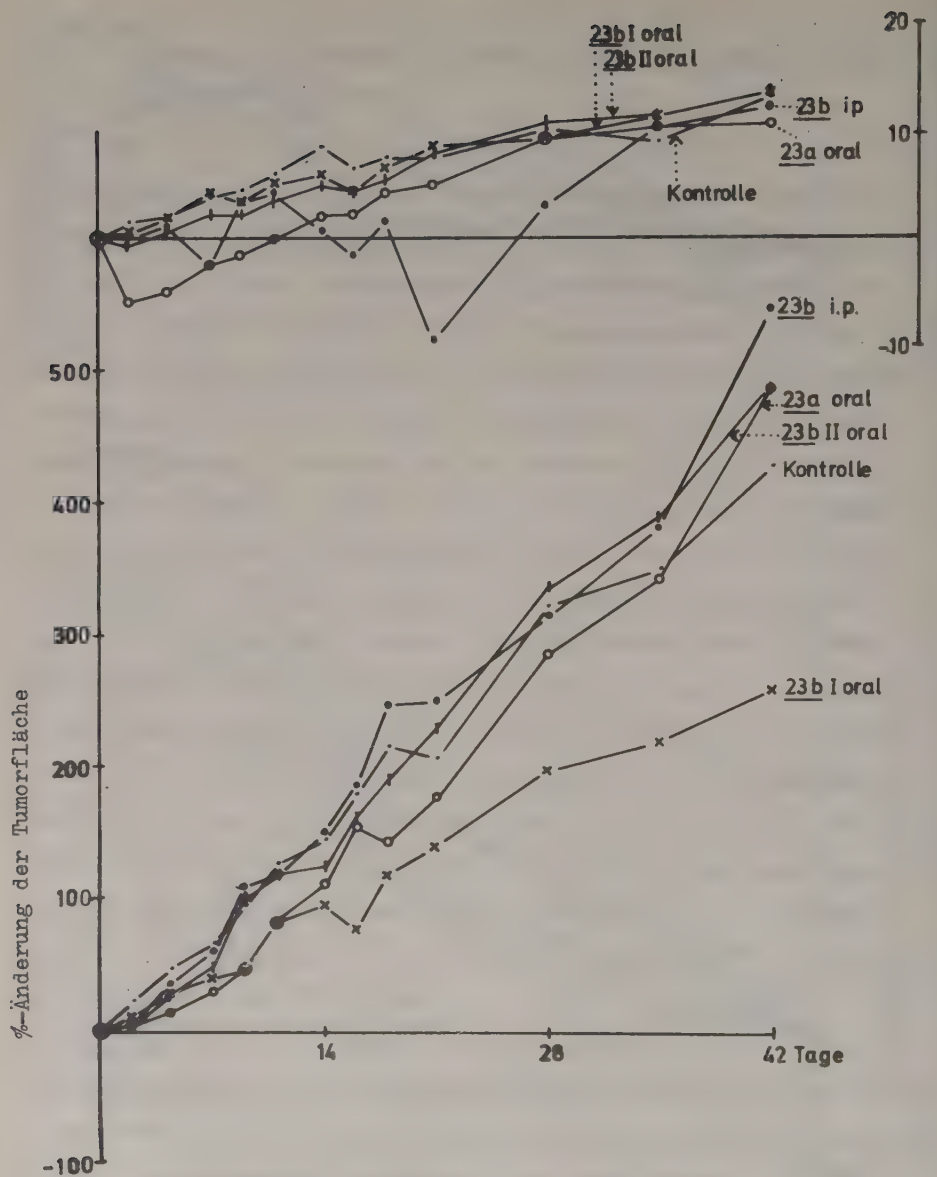


Abbildung 6: DMBA-induzierter Mammatumor der Ratte, Beeinflussung der Tumorfläche und des Körpergewichts nach Behandlung mit 23a und 23b in versch.Appl.im Vergleich zu Placebo

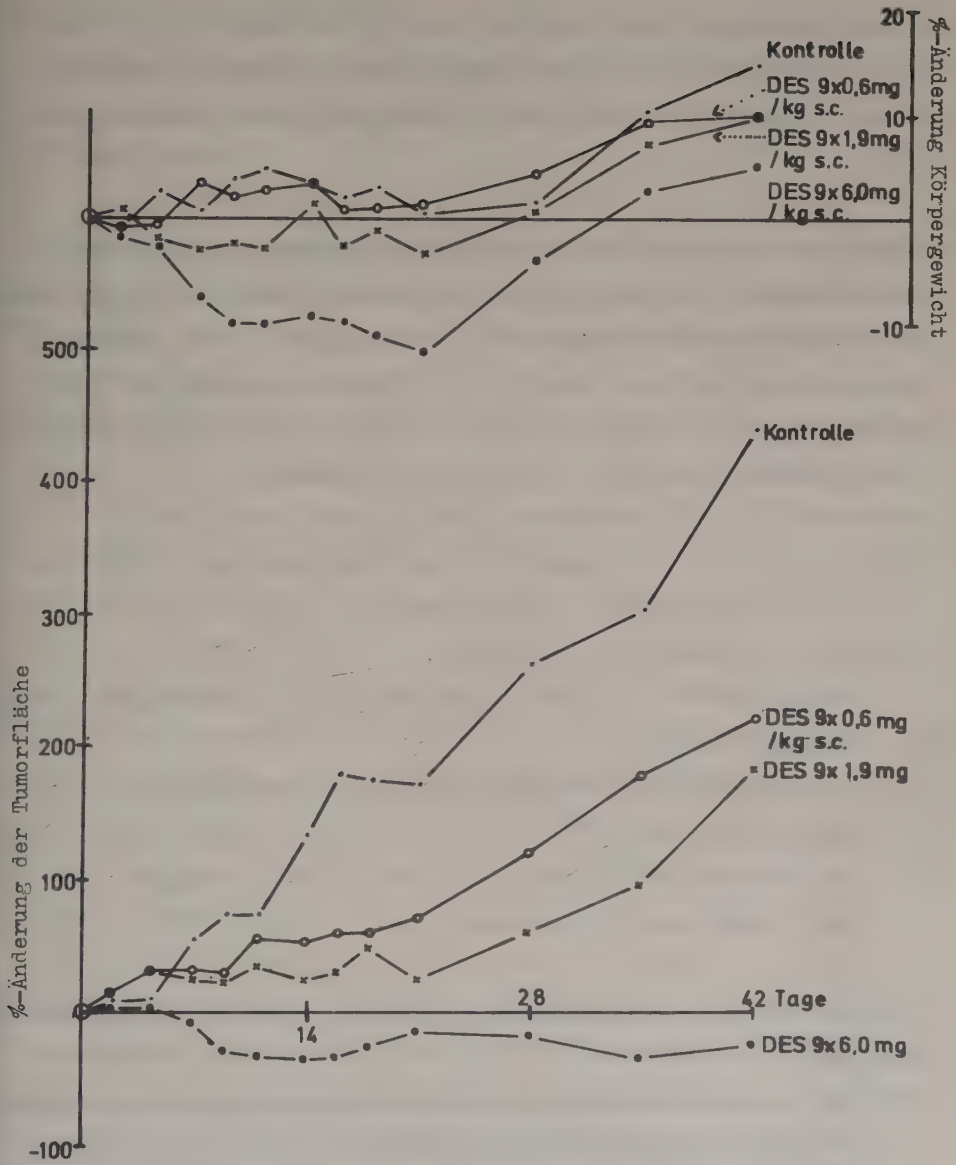


Abbildung 7: DMBA-induzierter Mammatumor der Ratte, Beeinflussung der Tumorfläche und des Körpergewichts nach Behandlung mit Diäthylstilböstrol (DES)

vorliegenden Daten waren innerhalb einer Behandlung positiv schief verteilt, und die Varianzen zu verschiedenen Zeitpunkten ungleich. Um die Voraussetzungen zu erfüllen, mußten die Daten transformiert werden.

LIENERT(87) schlägt für Verteilungen, deren Elemente nicht unabhängig voneinander sind, wie bei Zeit-Wirkungsverläufen, die logarithmische Transformation $x' = \log x + c$ (c= constans) vor. Die gleiche Transformation empfiehlt GRIMM(88) für Wachstumsprozesse mit einer unteren Schranke der x-Variablen (in unserem Fall stellt die völlige Tumorrückbildung mit x= 0 die untere Schranke dar).

Die mit $x' = \log x + 100$ transformierten Flächenquotienten erfüllten jetzt die Vorausstzungen der Varianzanalyse. Folgende Hypothesen wurden mit der Varianzanalyse überprüft:

1) Es bestehen keine Unterschiede zwischen den Behandlungen (Parallelverschiebung)

2) Es bestehen keine Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Behandlungskurven.

(3) Es bestehen keine Unterschiede zwischen den Zeitpunkten der Behandlungen(nicht interessant).

Hypothese 1 und (3) konnten verworfen werden zugunsten der Alternativhypothesen:

1a) Es bestehen Unterschiede zwischen den Behandlungen, die Behandlungskurven sind parallel verschoben.

(3a) Es bestehen Unterschiede zwischen den Zeitpunkten der Behandlungen, d.h. die Tumoren wachsen während des Versuches.

Hypothese 2 wurde beibehalten, d.h.im zeitlichen Verlauf der Behandlungskurven vorhandene, durch Drehung oder Deformation bewirkte Abweichungen vom parallelen Verlauf sind zufällig und liegen im Bereich des Versuchsfehlers.

Die die Hypothese 1a betreffenden Unterschiede zwischen den Behandlungen wurden dahingehend weiteruntersucht, welche Behandlungen sich von den anderen unterscheiden. Dazu diente das Verfahren von SCHEFFÉ(89) zum multiplen Vergleich von Mittelwerten mit Hilfe sogenannter linearer Kontraste. Es stellte sich heraus, daß die Wachstumsverzögerung, die mit DES I (in einer Dosierung von 9 x 1,9mg/kg) erzielt wurde, sich von den anderen Behandlungen unterscheidet ($p < 0,1$; Begründung im Statistik-Teil E.IV.).

Antwort auf Frage 1:

Mit der varianzanalytischen Auswertung der Tumorflächenänderung lassen sich die tumorhemmenden Wirkungen von 5a und 14b, die in Abbildung 5 angedeutet werden, nicht statistisch absichern.

Antwort auf Frage 2:

Keines der getesteten ÄDA bewirkt eine signifikante Verminderung der Tumorfläche gegenüber den Kontrollen. Die Verbindungen 7b, 23a, 23b und 25a haben bei unterschiedlichen Applikationsarten in Bezug auf die Tumorflächenänderung keine gesicherte tumorhemmende Wirkung am DMBA-induzierten Mammatumor.

c) Klärung der Frage nach anorexigener Wirkung

In Abschnitt C.IV.1) c) wurden Zusammenhänge zwischen Substanzkonzentration und Futteraufnahme angedeutet, deren Ursache entweder mit geschmacklicher Beeinträchtigung des Futters oder appetitzügelnder Wirkung der ÄDA erklärbar wäre. Durch geeignete Applikationsarten wurde im letzten Versuch die geschmackliche Beeinträchtigung des Futters umgangen. In Tabelle 8a sind die Futteraufnahmen an allen Meßtagen (g/kg Ratte) der mit den mikroverkapselten ÄDA 23a nd 23b gefütterten Tiergruppen aufgeführt. Zur Überprüfung einheitlicher Futteraufnahmen wurde der einem multiplen Mittelwertsvergleich entsprechende Rangtest nach KRUSKAL und WALLIS(82) durchgeführt.
Ergebnis: Im Futterverbrauch sind im Vergleich zur Kontrolle keine echten Unterschiede nachweisbar.

Ebenfalls in Tabelle 8a ist die Futteraufnahme der Gruppe aufgeführt, die mit 23a als in Öl gelöster Base und oraler Schlundsonden-Applikation behandelt wurde. Der hier durchführbare Rangtest nach WILCXON(82) ergab einen signifikant unterschiedlichen, und zwar erniedrigten Futterverbrauch gegenüber der Kontrollgruppe($p<0,05$).

Die unterschiedliche Futteraufnahme bei 23a, die bei Schlundsondenapplikation signifikant erniedrigt ist, führte zu folgenden Überlegungen:
Da bei entsprechenden Versuchen von EGGINGER(90) die Freisetzung der Substanzen aus den Mikrokapseln im Magen der Tiere bestätigt worden ist, und die Ratten während 24 Stunden in zwei längeren Perioden fressen(91), kann bei den so gefütterten Tieren eine ziemlich gleich-

Tabelle 8a: Futteraufnahme während der Behandlung mit den mikroverkapselten Verb. 23a und 23b und der oral verabreichten, als Base in Öl gelösten Verb. 23a

Futteraufnahme am Meßtag(g/kg)**** / Verb.Nr. / Dosis	Kontrolle Placebo-pellets	23a* 1473***	23b* I 745***	23b* II 1356***	Kontrolle Normal-futter	23a** 780***
1	48	35	69	69	57	58
2	76	60	75	77	75	58
3	72	65	75	71	82	71
4	68	81	62	66	71	64
5	71	69	62	60	72	66
6	61	69	65	60	82	78
7	60	60	64	59	89	66
8	58	59	61	62	86	65
9	60	76	61	68	84	79
Summe	574	574	594	604	694	605
Mittelwert	63,8	63,8	66,0	66,8	77,1	67,2+

* mikroverkapselt

** Fütterung mit der Schlundsonde

\+ signifikant gegen Kontrolle ($p < 0,05$)

*** Gesamtdosis über 3 Wochen

**** 9 Meßtage während 3 Wochen

Tabelle 8b: Futteraufnahme während der dreiwöchigen Behandlung unter intraperitonealer bzw. subkutaner Applikation

Verb.Nr. / Futteraufnahme am Meßtag(g/kg) / Dosis	Kontrolle i.p.	DES I s.c. 3x1,9 mg/kg	DES II s.c. 3x0,6 mg/kg	23b i.p. 5x93 mg/kg	14b i.p. 5x91 mg/kg	5a i.p. 3x79 mg/kg	26a i.p. 5x9 mg/kg
1	77	56	64	78	71	31	44
2	88	54	67	81	80	25	54
3	91	60	82	93	68	94	57
4	90	102	90	93	80	83	72
5	85	73	67	87	87	83	76
6	80	80	90	77	75	85	74
7	71	82	71	66	87	73	70
8	71	81	79	65	80	66	66
9	76	78	75	70	76	70	91
Summe	729	666	685	710	704	610	604
Mittelwert	81	74	76	79	78	68	67+

+ signifikant gegen Kontrolle($p < 0,05$)

mäßige , enterale Resorption angenommen werden. Durch die mehrfache Wiederholung der Schlundsondenapplikation während des Versuches kann zum einen bei den Tieren ein Trauma verursacht werden, mit Auswirkungen auf die Futteraufnahme; zum anderen wird durch diese Applikation jeweils eine Blutspiegelspitze der Substanzkonzentration(91) hervorgerufen. Vielleicht wird dadurch eine schwache, appetitzügelnde Wirkung von 23a soweit verstärkt, daß sich die anorexigene Wirkung in diesem Fall statistisch absichern läßt. Der unterschiedliche Futterverbrauch der beiden Kontrollgruppen ist auf die Darreichungsform als Placebopellets zurückzuführen.

In Tabelle 8b sind nach dem gleichen Schema die ÄDA aufgeführt, die intraperitoneal appliziert wurden, und die weiter unten diskutierten Gruppen mit DES-Behandlung. Auffällig ist die stark verminderte Futteraufnahme der Verb. 5a und 25a innerhalb der ersten Versuchswoche (Meßtage 1-3). Dieser Effekt ist bei 5a im weiteren Verlauf nicht mehr erkennbar, während er bei 25a in abgeschwächter Form bis zum Behandlungsende andauert. Mit dem Rangtest ist der Futterverbrauchsunterschied bei 25a statistisch absicherbar ($p < 0,05$).
Beide Verbindungen zeigen in der angewandten Dosierung kurzzeitig eine appetithemmende Wirkung. Sie liegt im Bereich der $Dosis_{eff/2}$, die bei der Bewertung von Appetitzüglern benutzt wird. Die $Dosis_{eff/2}$ gibt die Tagesdosis an,die bei einmaliger oder fünfmaliger Gabe den Futterverbrauch um die Hälfte vermindert(92).

Zur Erklärung der anorexigenen Wirkung dieser ÄDA kommen zumindest zwei Möglichkeiten in Betracht:

a) Zur Verbindungsklasse typischer Appetitzügler mit Phenylalkylaminstruktur bestehen strukturelle Ähnlichkeiten(Ar-C-C-N). Zumindest bei kurzkettigen ÄDA konnten wir eine zentralerregende Wirkung im subtoxischen Bereich feststellen, die auch bei vielen Amphetaminabkömmlingen vorhanden ist. Es wäre ein Einfluß auf adrenerge Rezeptoren des Hunger- bzw. Sättigungszentrum im Hypothalamus denkbar. In diese Richtung weist auch der Befund von BRANDT(93), der mit 1,2-Diphenyläthylaminen indirekte adrenomimetische Effekte erzielte.

b) Die ÄDA sind strukturell von östrogen wirksamen Stilbenderivaten abgeleitet. DES selbst zeigt in der letzten Versuchsserie(Tab.8b) eine schwache anorexigene Wirkung. Andere Autoren berichten über ähnliche oder stärkere appetithemmende Wirkung von DES in entsprechenden Dosierungen(38,94,95). Es wird ein Angriff auf östrogenempfindliche Rezeptoren im Hypothalamus diskutiert, die zum Teil im Bereich des Hungerzentrums liegen(50).
Von KRANZFELDER(96) werden zur Zeit Versuche an aus Rattenuteri isolierten Östrogenrezeptoren durchgeführt, die eine Rezeptoraffinität derÄDA erkennen lassen. Für ÄDA könnte der gleiche Angriffspunkt auf das Hungerzentrum im Hypothalamus angenommen werden wie für DES, bzw. die natürlichen Östrogene.

Eine exakte Begründung dieser anorexigenen Wirkung bedarf weiterer Untersuchungen.

V. Vergleichende Tumorhemmung mit anderen therapeutischen Methoden

1) Tumorhemmung mit Diäthylstiböstrol

Diäthylstilböstrol(DES) wurde von GRISWOLD(38) am DMBA-induzierten Mammatumor der SD-Ratte ausführlich auf tumorhemmende Wirkung geprüft; mit Dosierungen von 5,5 , 1,7 und 0,55mg/kg Körpergewicht, 3 x wöchentlich subkutan verabreicht, wurden innerhalb von 30 Tagen Tumorgewichtsabnahmen von -83, -38 und -45% erzielt. Gleichzeitig verringerte sich das durchschnittliche Tiergewicht um Werte zwischen 7 und 12% des Ausgangsgewichts. Wir führten ähnliche Versuche mit Dosierungen von 3 x wöchentlich 6,0 , 1,9 und 0,6mg/kg DES s.c. durch. Die Ergebnisse von GRISWOLD und die eigenen Befunde sind vergleichend in Tabelle 9 dargestellt. Die Verlaufskurven der Tumorflächenänderung unserer Versuche sind aus Abbildung 7 zu entnehmen. Nach 21 Tagen erzielten wir mit der stärksten Dosierung eine Tumorflächenabnahme von -13%, unter gleichzeitiger Tiergewichtsreduktion von 12% (Nebenwirkung: gleichzeitiger Haarausfall bei 50% der Tiere). Bei einer Dosierung von 1,9mg war nur noch ein gegenüber der Kontroll- signifikant verzögertes Tumorflächenwachstum ($p < 0,05$) feststellbar, unter gleichzeitiger Tiergewichtsreduktion von ca. 3%, während mit der schwächsten Dosierung von 0,6mg ein verzögertes Wachstum der Tumorfläche (nicht signifikant) unter Vermeidung von Körpergewichtsverlusten erreicht wurde. In der anschließenden, dreiwöchigen Beobachtungszeit blieb der Hemmeffekt der stärksten Dosierung unter gleichzeitiger Tiergewichtszunahme erhalten.Bei der mittleren Dosierung war der Kurvenverlauf noch signifikant von der Kontrolle verschieden;

das Tiergewicht erreichte fast den Kontrollwert. Bei der Dosis von 0,6mg/kg lagen Unterschiede im Kurvenverlauf der Tumorflächenänderung schon im Bereich des Versuchsfehlers(siehe Seite 60-65), und die Körpergewichtskurve deckte sich mit der Kontrollgruppe.

Tabelle 9: Tumorhemmende Wirkung von DES, Vergleich der eigenen Ergebnisse mit dem Versuch von GRISWOLD(38)

Dosis mg/kg s.c.	Tumorflächen-änderung in % nach 21 Tagen	Tumorgewichts-änderung in % nach 30 Tagen	Tiergewichts-änderung in % 21 Tg.	30 Tg.	Sterblichkeit gestorben/ überlebend
6,0	-13^{+*}		-12		0/20
$5,5^{G}$		-83		-12	3/10
1,9	$+25^{+*}$		-3		1/10
$1,7^{G}$		-58		-7	5/10
0,6	$+73^{+}$		+1		1/10
$0,55^{G}$		-48		-7	2/10
Kontr.	+171		+1		0/10
$Kontr.^{G}$		+90	+8		0/10

G Ergebnisse des Versuchs von GRISWOLD(38)

\+ nach 21 Tagen ist die Zahl der Tumoren mit verzögertem Wachstum signifikant erhöht gegen die Kontrolle($p < 0,05$)

* nach 6 Wochen signifikanter Unterschied der Tumorfläche zur Kontrolle($p < 0,05$)

Beurteilung:

Es kann nicht entschieden werden, wieweit die anorexigene Wirkung von DES bei den Versuchen von GRISWOLD das Tumorwachstum hemmend beeinflußt hat. Die eigenen Versuche waren darauf ausgerichtet, DES in einer Dosierung zu verabreichen, die keine Tiergewichtsreduktion mehr verursacht. Dadurch wurde die Tumorhemmwirkung bis zum Bereich der Wirkstärke von ÄDA 5a und 14b (Seite 59) abgeschwächt. Der Vergleich der Kontrollgruppen des GRISWOLD'schen und des eigenen Versuches zeigt ein schnelleres Wachstum (erhöhte Malignität, geringere Hormonabhängigkeit ?) für unser Modell. Es ist wahrscheinlich die Ursache für die schwere Beeinflußbarkeit durch DES.

Nach MEITES(94) hat DES bei der Ratte eine appetitzügelnde Wirkung; sie ist dosisabhängig. Angriffspunkt ist das laterale, hypothalamische "feeding center". Der anorexigene Effekt kommt bei hyperphagischen, fettsüchtigen Mäusen*) verstärkt zur Geltung. Ursache ist eine erhöhte Empfindlichkeit des "feeding centers" als Folge der Unterbrechung der afferenten Verknüpfungen mit dem ventromedialen Kern(95). Im Bereich der mittleren Region des Hypothalamus sind Östrogenrezeptoren nachweisbar. Man nimmt an, daß DES über eine Ausschüttung neurohumoraler Faktoren aus hypothalamischen Speichern seine Wirkung hervorruft.

Die Wirkung von DES am hormonabhängigen Mammatumor kommt vermutlich vorwiegend durch den futtereinschränkenden Effekt zustande.

*) Die elektrolytische Zerstörung der neuromedialen Nuclei des Hypothalamus führt zu hyperphagischen, fettsüchtigen Mäusen(95).

Sie wird wahrscheinlich durch zelltoxische Effekte von DES(Haarausfall ?) verstärkt, die auch bei anderen hochdosierten Östrogenen diskutiert werden (siehe C.I.3) und 4), S.25 und 26). Außerdem geht der Tumor nach Östrogengaben von einer Proliferations- in eine Sekretinsphase über(Erhöhung der G-6-P-Dehydrogenaseaktivitäten, Anstieg des Triglyceridspiegels(75)).

2) Tumorhemmung durch Ovarektomie

Ausführliche Untersuchungen über Tumoralter und -größe und Hormonempfindlichkeit sind von GRISWOLD(49) durchgeführt worden. Er stellte bei Tumoren, deren Trägertiere 120 Tage nach der DMBA-Behandlung ovarektomiert wurden, innerhalb von 6 Wochen eine Tumorgewichtsänderung von 80% des Ausgangsgewichtes fest; die Tumorzahl ging im Durchschnitt um -42% zurück.
Wir erzielten mit unserem Tumormodell unter den gleichen Bedingungen analoge Ergebnisse: Bei 9 Tieren ging die Tumorfläche innerhalb von 5 Wochen nach Ovarektomie um -68% zurück. Die mittlere Tumorzahl verringerte sich um 42%. Während der nächsten 3 Wochen vergrößerte sich die Tumorfläche auf -32% der Anfangsfläche. Dann wurde der Versuch abgebrochen. In Abbildung 8 sind die Mittelwerte der prozentualen Tumorflächen-(untere Kurve) und Tiergewichtsänderungen(obere Kurve) von Versuchs- und Kontrollgruppe gegen die Versuchstage aufgetragen. Bei GRISWOLD erfolgte nach dem Minimum in der 6.Woche ebenfalls eine Zunahme des mittleren Tumorgewichts; nach 18 Wochen war das Ausgangsgewicht zum Zeitpunkt der Ovarektomie wieder erreicht.

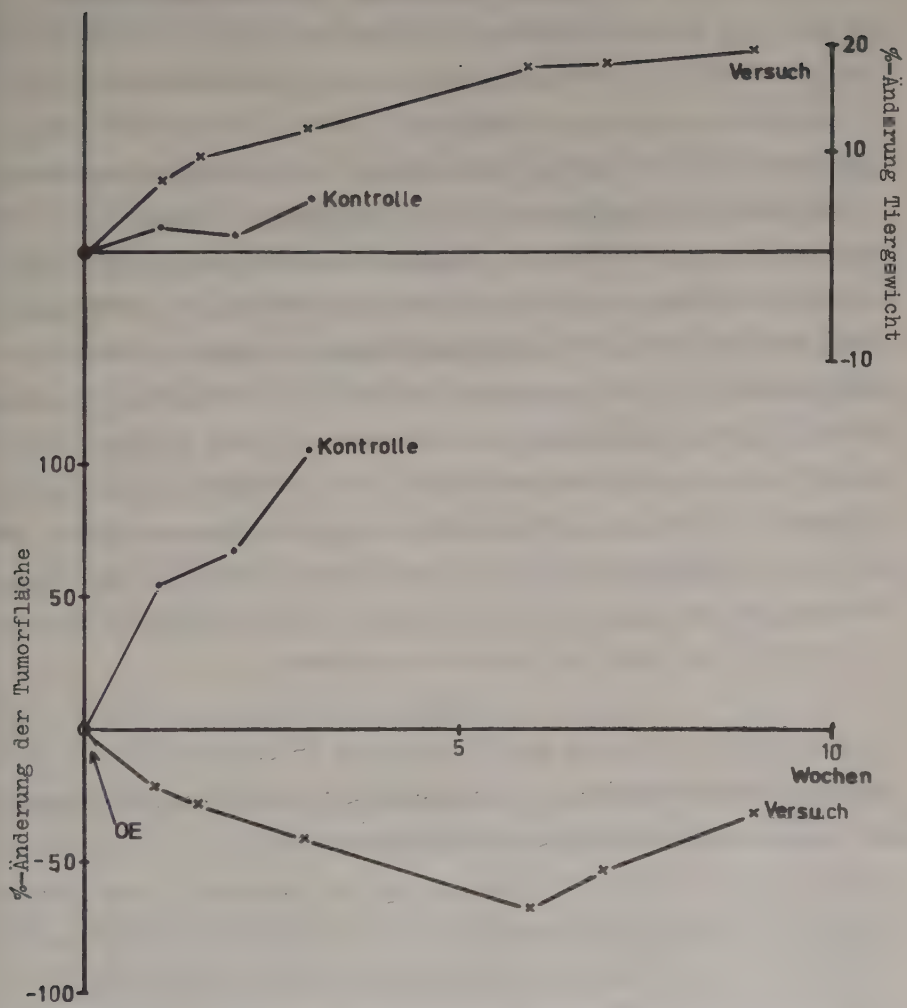


Abbildung 8: DMBA-induzierter Mammatumor der Ratte, Beeinflussung der Tumorfläche durch Ovarektomie(OE) 120 Tage nach der DMBA-Applikation

Die tumorhemmende Wirkung der Ovarektomie wird auf den direkten Östrogen- und Progesteronentzug zurückgeführt(31,38). Die in der Einleitung beschriebene Abhängigkeit(S.31) des Tumorstoffwechsels von der hormonell gesteuerten Genexpression führt zu der beschriebenen Angleichung der Stoffwechselverhältnisse an das normale Brustgewebe *), und damit zur Tumorhemmung. Die tumorhemmende Wirkung ist allerdings durch den irreversiblen Übergangs eines Teils der Tumorzellen zur Hormonunabhängigkeit zeitlich begrenzt(94). Es wird auch diskutiert, daß von vorneherein hormonabhängige und -unabhängige Zellen nebeneinander im Tumor vorkommen, und daß die unabhängigen Zellen die hormonellen Milieuänderungen besser tolerieren; sie überleben den Eingriff und proliferieren weiter(98). Mit zunehmender Hormonunabhängigkeit der Tumoren wird eine Abnahme der Östrogenrezeptoren, welche an der Hormonwirkung beteiligt sind, beobachtet(98). Das erneute Tumorwachstum wird auch mit der Übernahme der Östrogen- und Progesteronproduktion durch die Nebennieren erklärt.

Die bei unseren Versuchen nach Ovarektomie zu beobachtende, verstärkte Körpergewichtszunahme ist auf endokrine Veränderungen zurückzuführen; sie sind durch Östrogene antagonisierbar(99).

*) (Isoenzymmuster, Senkung der erhöhten Aktivität von Schlüsselenzymen der Glycolyse,- Glycolyse und Wachstum korrelieren)

3) Tumorhemmung durch Futtereinschränkung

a) von hormonabhängigen Tumoren

In Abschnitt C.IV.1)b) ist ein Versuch als Kontrolle 2 beschrieben, bei dem durch eine Reduzierung des Futterangebotes um durchschnittlich 35% eine Tumorflächenänderung von -29% der Anfangsfläche erzielt werden konnte, gegenüber einer Flächenzunahme von 209% bei den Kontrolltieren 1 ohne Futtereinschränkung. Die Tumoren dieses Versuches waren alle im ersten Drittel eines Zeitraumes von 70 Tagen aufgetreten, in dem die Tumoren in der Mehrzahl hormonabhängig und daher therapiegeeignet sind(50. - 120. Tag nach DMBA-Applikation). Da die Tumoren bei längerer Versuchsdauer zunehmend hormonunabhängig werden(49), interessierte uns die Beeinflußbarkeit hormonabhängiger Tumoren durch Futtereinschränkung im Vergleich zu hormonunabhängigen Tumoren.

b) von hormonunabhängigen Tumoren

Wir postulierten Hormonunabhängigkeit bei solchen Tumoren, die nach beidseitiger Ovarektomie der Trägertiere und zwischenzeitlicher Rückbildung erneut Wachstum zeigten. Wir erreichten bei 5 derartig behandelten Tieren durch genau gleiche Futtereinschränkung wie bei Versuch a, im Verhältnis dieselbe Körpergewichtsabnahme, bei um 37% höherem Anfangsgewicht.

Die Tumorfläche änderte sich um +7% gegenüber +38% bei 5 gleichbehandelten Kontrolltieren nach 21 Tagen, um +8% bzw. +69% nach 28 Tagen (nicht signifikant nach WILCOXON(82)).

Die Verlaufskurven der hormonabhängigen und -unabhängigen Tumorflächenänderungen sind einschließlich der zugehörigen Kontrollgruppen in Abbildung 9 dargestellt: auf der Abszisse sind die Versuchstage, auf der Ordinate die Prozentwerte der Flächenänderung aufgetragen; eine zweite Prozentskala auf der Ordinate bezieht sich auf die durchschnittlichen Tiergewichtsänderungen.
Die langsamer wachsenden, älteren, höchstwahrscheinlich hormonunabhängigen Tumoren sind durch Futtereinschränkung schwerer zu beeinflussen als junge, hormonabhängige Mammatumoren.

c) Diskussion

GROPPER et al.(100)erreichten bei 3-Methylcholanthren-induzierten Mammatumoren weiblicher Wistar-Ratten durch 12-prozentige Körpergewichtsreduktion nach 6 Wochen einen Tumorgewichtsrückgang auf 40% der Kontrolle(nicht signifikant). GRISWOLD(38) verminderte das Futterangebot für mammatumortragende SD-Ratten in der Weise, daß das Körpergewicht innerhalb von 12 Wochen um 25% abnahm. Dabei ging das Tumorgewicht um durchschnittlich 80% der Kontrolle zurück, war aber wegen der starken Streuung nicht mit dem Körpergewicht korrelierbar. Anderseits läßt sich durch Futterreduktion auch die Häufigkeit des spontanen, hormonunabhängigen Mammatumors der Maus reduzieren(101, 102) und die Latenzzeit von Östrogen-induzierten Mammatumoren verlängern(103). Im Gegensatz dazu erhöht eine fettreiche Diät während der Latenzzeit die Tumorausbeuten bei verschiedenen, induzierbaren und spontanen Ratten- und Mäusetumoren(104-106).

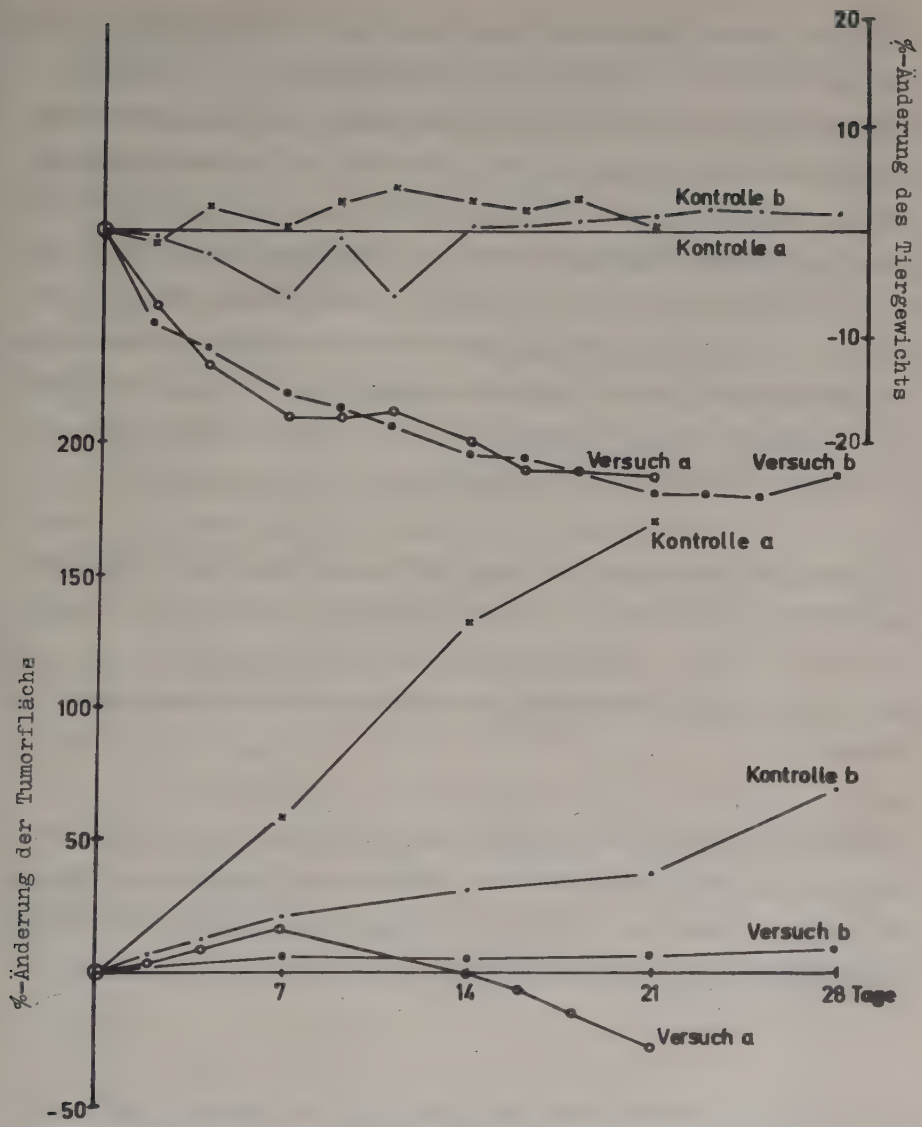


Abb.9: DMBA-induzierter Mammatumor der Ratte, Beeinflussung der Tumorfläche und des Körpergewichts durch Futtereinschränkung:
a) junge,(9-11 Wochen nach DMBA-Appl.)hormonabhängige Tumoren
b) nach Ovarektomie rekurrierende, hormonunabhängige Tumoren

All diese Befunde untermauern die Bedeutung der Ernährung für Entstehung und Wachstum des experimentellen Mammatumors. Die Futtereinschränkung führt bei weibl. Ratten zu tiefgreifenden Veränderungen der endokrinen Verhältnisse(107); das kommt in Östrusunregelmäßigkeiten, die bis zum Anöstrus führen können, und weitgehender Atrophie des Brustgewebes zum Ausdruck; die endogene Östrogenproduktion ist erniedrigt. Man spricht von einer "Pseudohypophysektomie", die Hypophyse reagiert auf den Östrogenstimulus mit einem geringeren Ausstoß mammatroper Stoffe. Durch das verminderte, endogene Östrogenangebot sind vorallem Rückwirkungen auf die Proliferation des hormonabhängigen Mammatumors zu erwarten(siehe S.24 "Zellcyclus").

Aufgrund der starken Abhängigkeit der Genexpression von Ernährung und hormonellem Milieu(71) ist das rückläufige Wachstum der hormonabhängigen Tumoren erklärbar: diese Tumoren sind noch nicht so stark entartet, daß ihr Stoffwechsel schon weitgehend unabhängig wäre vom Trägertier.

Im Gegensatz dazu ist von verschiedenen hormonunabhängigen Tumoren, wie Lymphosarcomen und Hepatomen, bekannt, daß Glycolyse und Wachstum auch bei Hungerzuständen und niedrigem Glucosegehalt der Tumoren unverändert schnell ablaufen(108).

VI. Diskussion

In den Tabellen 10 A(im Ring unsubstituierte Verbindungen) und 10 B (im Ring substituierte Verb.) sind die am DMBA-induzierten Mammatumor erzielten Versuchsergebnisse für diejenigen ÄDA aufgeführt, die nach der Vorprüfung für eine eingehende Testung, unter Verwendung verschiedener Applikationsarten und Dosierungen , ausgewählt wurden. Zum Vergleich sind die Ergebnisse der Vorversuche dargestellt, die von STEINHOFF*) mit unseren Verbindungen am Benzidin-induzierten Mammatumor durchgeführt worden sind. Neben den Angaben über Tumorinduktion, Tierzahl, Gesamtdosis, Zahl der Einzeldosen , Zubereitungsform und Applikationsart, enthalten die Tabellen die Prozentzahlen der Tiergewichtsänderung in der ersten Versuchswoche, die Ursache von Tumorhemmungen sein können. Zur Beurteilung der tumorhemmenden Wirkung am 21. Versuchstag wurden drei Kriterien berücksichtigt:

1) der Prozentanteil der Tumoren, die sich völlig zurückbilden, oder kein Wachstum zeigen;

2) die mittlere prozentuale Tumorflächenänderung aller Tiere einer Versuchsgruppe gegenüber der Tumorfläche zu Therapiebeginn;

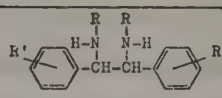
3) der Quotient aus Gesamttumorfläche der Behandlungs- und entsprechenden Kontrollgruppe.

Signifikante Hemmeffekte nach Kriterium 1 und 2 sind gekennzeichnet ($p < 0,05$).

Eine sichere Auswahl der für eine eingehende Prüfung interessanten ÄDA war aufgrund der Vorversuche nicht möglich. Die fehlende Reprodu-

*) Siehe Fußnote von Seite 54

Tabelle 10 A: Zusammenfassung der Ergebnisse, Stoffgruppe A



x 2 HCl

a , b

a = racem R = Alkyl C_1-C_6

b = meso R' = H

Verb. Nr.	Tumor-induktor§	Tierzahl	Gesamtdosis mg/kg	Zahl d. Einzeldosen	Zubereitung§§	Appl. Art	%-Tiergewichtänderung*	Tumorhemmung nach 21 Tagen: %-Anteil TH**	% Tumorflächenänder.***	T/C****
4a	D	5	185	3	a)	s.c.	2	33	82	0,42
	D	10	111	21	b)	oral	-4	38	67	0,60
	BS		30	15		oral			xxx	0,10
5a	D	5	1192	3	a)	s.c.	-8	50	69	0,93
	D	0	1192	15	e)	i.p.	-13-)	48	138	0,91
	BS		20	1		s.c.			x	0,62
7b	D	5	1192	3	a)	s.c.	7	80	-3	0,40
	D	5	1192	3	a)	s.c.	0	21	92	0,72
	D	10	483	21	b)	oral	-14-)	50	-38	0,25
	D	10	596	21	d)	oral	1	12	204	1,18
	D	15	672	15	e)	i.p.	-1	27	229	1,07
	BS		320	15		s.c.			x	0,50
11a	D	5	1277	3	a)	s.c.	-3	14	51	0,68
	D	10	380	21	b)	oral	-16-)	87	-42	0,20
	D	10	1020	21	d)	oral	4	59+	47	0,83
	BS		300	15		s.c.			xxx	
14b	D	5	1360	3	a)	s.c.	-4	40	14	0,77
	D	10	1360	15	e)	i.p.	2	48+	64	0,67
Ovarekt.	D	9	-	-	-	-	7	94+	-40+	0,15
Kontrolle§§§	D	10	-	-	e)	i.p.	4	21	228	-

* nach 5 Tagen Versuchsdauer

** TH = Anteil der Tumoren an der Gesamttumorzahl mit gehemmtem Wachstum

*** Mittelwert der Tiere einer Behandlungsgruppe

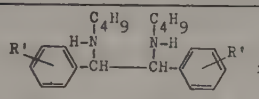
**** T/C = Quotient aus der Gesamttumorfläche der Behandlungs- und Kontrollgruppe der entsprechenden Versuchsserie

§ D =DMBA BS = Benzidin, Versuchsergebnisse von STEINHOFF

§§ Zubereitungsformen: a) wässerige Suspension der ÄDAx2HCl, b) ÄDAx2HCl-Futterpellets c) mikroverkapselte ÄDAx2HCl-Futterpellets, d) ÄDA-Basen in Milch e) ÄDA-Basen zu 10% in Erdnußöl

Fortsetzung bei Tabelle 10 B

Tabelle 10 B: Zusammenfassung der Ergebnisse, Stoffgruppe B



a , b

a = racem R' = CH_3 oder Hal

b = meso

Verb.Nr.	Tumor-induktion§	Tier-zahl	Gesamt-dosis mg/kg	Zahl d. Einzel-dosen	Zube-reitung§§	Appl. Art	%-Tier gewicht-änderung*	Tumorhemmung nach 21 Tagen: %-Anteil TH**	% Tumor-flächen änder.***	T/C****
23a	D	5	1400	5	a)	s.c.	2	22	117	0,72
	D	9	785	21	b)	oral	-8-)	60	37	0,58
	D	10	1060	21	d)	oral	-1	15	178	0,87
	D	15	786	15	e)	oral	-3+	30	188	0,98
	D	10	1400	21	c)	oral	-5	30	178	0,59
	BS								x	
23b	D	5	1400	3	a)	s.c.	0	20	53	1,44
	D	5	1400	3	a)	s.c.	1	33	29	0,49
	D	10	938	21	b)	oral	-8-)	50	16	0,48
	D	9	745	21	c)	oral	2	22	142	0,52
	D	10	1470	21	c)	oral	1	11	233	0,84
	D	10	1400	15	e)	i.p.	2	23	254	0,93
	BS								xxx	
24b	D	5	1400	3	a)	s.c.	0	29	41	0,49
	D	9	2060	21	d)	oral	0	39	105	0,87
	BS								xxx	
25a	D	10	1400	15	e)	i.p.	-5+	42+	78	0,72
DES	D	10	1,8	3	a)	s.c.	0	50+	73	0,80
	D	10	5,7	3	a)	s.c.	-2	54+	25+	0,37
	D	10	18,0	3	a)	s.c.	-3	63+	-13+	0,32
Kontrolle§§§	D	10	-	-	e)	i.p.	4	21	228	-

Fortsetzung von Tabelle 10 A:

§§§ Kontrollgruppe der letzten Versuchsserie

-) Durch verminderte Futteraufnahme bedingte Gewichtsabnahme, die Tumorhemmung bewirkt

+ signifikanter Unterschied zur Kontrolle (p 0,05)

x verzögertes Tumorwachstums

xx Wachstumshemmung bis 10 Tage nach Therapiebeginn

xxx Wachstumshemmung über 20 Tage nach Therapiebeginn

zierbarkeit dieser Ergebnisse ist in der Uneinheitlichkeit des Tumormodells(Ansteigen der Tumorhäufigkeit bei den verschiedenen Versuchsserien) , der nicht befriedigenden Zubereitungsform der Verbindungen als Suspensionen, der unsicheren subkutanen Applikation, der geringen Tierzahl und der damit verbundenen statistischen Unsicherheit begründet

Die Auswahl der Verbindungen 4a, 5a, 7b, 11a, 14b, 23a, 23b, 24b und 25a für die eingehende Nachprüfung erfolgte daher mehr oder weniger willkürlich.

Die Verb. 4a, 7b, 11a, 23a und 23b zeigten bei oraler Applikation in Form von Futterpellets in der Mehrzahl der Fälle deutliche Tumorhemmungen(diese Verb. waren auch am Benzidin-induzierten Mammatumor als wirksam erkannt worden). Die Tumorhemmungen sind entweder teilweise oder hauptsächlich durch die Einschränkung der Futteraufnahme und den damit verbundenen Körpergewichtsverlust, aufgrund von Geschmacks- oder appetitzügelnder Wirkung, bedingt. Darauf deutet die Wiederholung der Versuche mit mikroverkapselten Pellets der Verb. 23a und 23b hin. Signifikante appetitzügelnde Effekte wurden bei 23a und 25a festgestellt.

Von den Verb. 7a, 7b, 11a, 11b, 12a, 12b, 17a, 17b, 23a und 23b, die in Form einer Milchemulsion den Tumortieren zum Trinken angeboten wurden,zeigt nur 11a, mit einem verzweigten Pentyl-Rest als Substituenten R, eine signifikante Erhöhung des Prozentanteils der Tumoren mit verzögertem Wachstum, ohne gleichzeitige Reduktion des Körpergewichts. Dieser Effekt liegt aber weit unter dem von STEINHOFF erzielten Ergebnis, der am Benzidin-Tumor einen über 3 Wochen anhaltenden Wachstumsstillstand erreichte.

Die intraperitoneale Applikation von 5a, 7b, 14b, 23b und 25a als Basen in öliger Lösung führte im Falle von 5a, 14b und 25a zu einer signifikanten Erhöhung der Zahl der Tumoren mit gehemmtem Wachstum. Dieser Effekt war bei 14b nicht von einer erniedrigten Futteraufnahme mit Einfluß auf das Körpergewicht begleitet, wie bei 5a und 25a. Die Verb. 5a zeigt auch am Benzidin-induzierten Mammatumor eine Hemmwirkung.

Die als positive Kontrollen aufzufassenden Versuche der Tumorhemmung durch Ovarektomie und DES-Behandlung zeigen die deutliche Überlegenheit der Organablation bei hormonabhängigen Tumoren. Nur hier werden unter Vermeidung von Körpergewichtsverlusten auch signifikante Tumorflächenabnahmen erzielt, während bei der DES-Therapie mit der, auf Beibehaltung des Körpergewichts abzielenden,geringsten Dosierung nur eine signifikante Erhöhung der Tumorzahl mit Wachstumshemmung(TH) erreicht wird.Die mit DES erzielte tumorhemmende Wirkung liegt in demselben Bereich wie die der beiden schwach wirksamen ÄDA Nr. 11a (racem-N,N'-Di-3-methylbutyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin) und 14b (meso-N,N'-Di-3,3-dimethylbutyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin)

Die vielfach beschriebene mammatumorhemmende Wirkung von DES ist vorwiegend auf den appetitzügelnden Effekt zurückzuführen, obwohl auch andere Wirkungsursachen(z.B. cytotoxische Wirkung, Auslösung einer Sekretionsphase) eine Rolle spielen dürften.

Die am DMBA-induzierten Mammatumor durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß das von uns benutzte Versuchsmodell für das Auffinden mäßig wirkender Verbindungen nur begrenzt brauchbar ist. Im Wachstumsverhalten und in der Beeinflußbarkeit durch DES sind im Vergleich mit den von GRISWOLD(38) beschriebenen Versuchen deutliche Unterschiede vorhanden. Unsere Tumoren wachsen schneller und sind weniger empfindlich gegen DES. Dadurch wird die Erkennung der schwachen, tumorhemmenden Eigenschaften der ÄDA erschwert. Diese Tatsache berücksichtigen wir bei den Auswertungsmethoden, indem wir den "schwachen", nur wenige Informationen liefernden Mehrfelder-Test für die klassifizierten Tumorhäufigkeiten anwenden, und damit bei einigen Vertretern dieser Stoffklasse signifikante Unterschiede feststellen.

Keine der geprüften Verbindungen hemmt dagegen das Tumorwachstum unter gleichzeitiger Vermeidung von Körpergewichtsverlusten in dem Masse, daß unter Zugrundelegung der Tumorflächenänderung mit dem, am Versuchsende durchgeführten, einem mehrfachen t-Test entsprechenden Rangtest ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle bestätigt werden kann. Ein Grund dafür ist die starke Streuung der Meßwerte, die sich aus Fehlern der Längenmessung(am lebenden Tier) und der, bei diesem Versuchsmodell sehr großen, biologischen Streuung zusammensetzt.

Zusätzliche Varianzeninhomogenität hat zur Folge, daß die Varianzanalyse von Zeit-Wirkungsverläufen nur mit den transformierten Werten der letzten Versuchsserie durchgeführt werden kann und, außer für DES, keine signifikante Tumorhemmung bestätigt(der DES-Effekt wird durch die gleichzeitige Körpergewichtsreduktion beeinträchtigt).

Die Quotientenbildung aus Gesamttumorfläche der Behandlungs- und Kontrollgruppe am Versuchsende läßt sich nicht statistisch auswerten und dient hauptsächlich dem Vergleich mit den STEINHOFF-Ergebnissen; die Aussagekraft dieser Bewertung ist begenzt.

Für mammatumorhemmende ÄDA sind folgende Wirkmechanismen zu diskutieren:

1) ÄDA wirken in den verwendeten Dosen als hochdosierte Östrogene, wobei zwischen Eingriffen auf der Ebene der Mammatumorzelle und im Bereich der endokrinen Steuerung unterschieden werden muß (beide Bereiche beeinflussen sich aber auch gegenseitig):
   a) zellulärer Bereich: es kommt zu den beschriebenen Veränderungen(Seite 25), wie erhöhten Zellverlustraten, Änderungen des Immunmechanismus und cytotoxischen Effekten, aufgrund der unphysiologischen Hormonkonzentration;
   b) endokriner Bereich: der Angriff erfolgt sowohl an hypophysären als auch an hypothalamischen Östrogenrezeptoren, und führt in der Hypophyse zu einer starken Stimulation der Prolaktinsynthese. Es kommt zur allmählichen Erschöpfung der PIF-Speicher des Hypothalamus(63). Das zur Aufrechterhaltung des Tumorwachstums erforderliche Gleichgewicht Prolaktin-Östradiol wird gestört(Seite 28, Antagonismus von Prolaktin und Östrogen in der Tumorzelle). Vielleicht sind damit auch der nach hohen Östrogengaben zu beobachtende Anstieg der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase-Aktivität, und der Übergang der Tumorzellen in eine sekretorische Phase erklärbar. Es erhebt sich außerdem die Frage, ob die, durch hypothalamischen Östrogenangriff verursachte, appetitzügelnde Wirkung

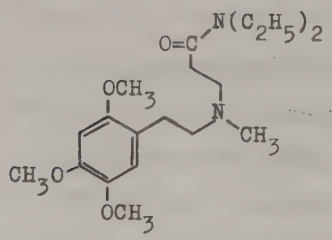
(wie bei DES) den Glycolysestoffwechsel der Tumorzelle beeinflußt und die Wachstumshemmung über ein Substratdefizit erfolgt. Diese Überlegung gilt allerdings nur für Verbindungen, bei denen neben tumorhemmenden Effekten gleichzeitig eine Reduktion des Körpergewichts festgestellt wurde.

2) ÄDA wirken als Antiöstrogene; auch hier ist der Angriff auf zwei Ebenen möglich:

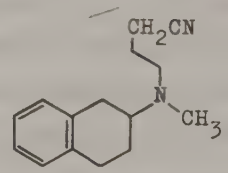
a) zellulärer Bereich: es unterbleibt die durch Östrogen verursachte Wachstumsstimulierung des Tumors durch kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung;

b) endokriner Bereich: infolge der Wechselwirkung mit hypophysären und hypothalamischen Östrogenrezeptoren sinkt der Prolaktinspiegel(wie z.B. durch Nafoxidin(68); dadurch wird das Tumorwachstum indirekt beeinflußt, Seite 29).

3) ÄDA wirken indirekt über eine Hemmung der Prolaktinfreisetzung, analog dem Ergotalkaloid Ergocornin(67). Ein vom Ergocornin abgeleitetes Phenyläthylaminderivat(I) und ein entsprechendes Aminotetralinderivat(II) hemmen in vitro ebenfalls die Prolaktinfreisetzung(109).



I



II

Die Phenyläthylamin-struktur ist auch in ÄDA enthalten(Seite 70, anorexigene Wirkung). Als Wirkmechanismus ist ein Angriff in die, über Catecholamin-Transmitter ablaufende, Regelung der PIF-Ausschüttung zu diskutieren(Seite 29, Antagonisierung des Reserpineffektes).

Die Wahrscheinlichkeit, daß nur einer der diskutierten Wirkmechanismen zutrifft, ist sehr gering. Die Entscheidung über die Art des vorliegenden Wirkmechanismus bedarf weiterer intensiver Untersuchungen, z.B. zur Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung, zur cytotoxischen Wirkung auf DMBA-Tumorzellen in vitro und zur östrogenen bzw. antiöstrogenen Wirkung in vivo.
Aus den vorliegenden Ergebnissen lassen sich keine Struktur-Wirkungsbeziehungen ableiten.

D. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Herstellung der N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamine

1) Synthese der Schiff'schen Basen

1 Mol aromatischer Aldehyd wird mit 1,1 Mol Alkylamin in kleinen Anteilen unter Rühren und Kühlen im Eisbad versetzt. Anschließend fügt man das gleiche Volumen Chloroform hinzu und trennt die wässerige Phase im Scheidetrichter ab. Die organische Phase wird mit getrocknetem Natriumsulfat vom Wasser befreit und eingeengt. Der Rückstand wird im Wasserstrahlvakuum destilliert.

A Ringunsubstituierte Alkyl-benzyliden-amine

1. Methyl-benzyliden-amin (110)
   Ausbeute 83% d. Th. Sdp.$_{14}$ 68°
   C_8H_9N (119,2)

2. Äthyl-benzyliden-amin (110)
   Ausbeute 86% d.Th. Sdp.$_{13}$ 71°
   $C_9H_{11}N$ (133,2)

3. Propyl-benzyliden-amin (110)
   Ausbeute 87% d.Th. Sdp.$_{14}$ 79-80°
   $C_{10}H_{13}N$ (147,2)

4. Isopropyl-benzyliden-amin (110)

Ausbeute 90% d.Th. Sdp.$_{14}$ 83°

$C_{10}H_{13}N$ (147,2)

5. Butyl-benzyliden-amin (111)

Ausbeute 92% d.Th. Sdp.$_{14}$ 112-3°

$C_{11}H_{15}N$ (161,2)

6. Isobutyl-benzyliden-amin (110)

Ausbeute 78% d.Th. Sdp.$_{15}$ 102°

$C_{11}H_{15}N$ (161,2)

7. sek-Butyl-benzyliden-amin (112)

Ausbeute 80% d.Th. Sdp.$_{16}$ 96°

$C_{11}H_{15}N$ (161,2)

8. tert-Butyl-benzyliden-amin (27)

Ausbeute 70% d.Th. Sdp.$_{15}$ 90°

$C_{11}H_{15}N$ (161,2)

9. Pentyl-benzyliden-amin (111)

Ausbeute 84% d.Th. Sdp.$_{16}$ 123°

$C_{12}H_{17}N$ (175,3)

10. 2-Methyl-butyl-benzyliden-amin

Ausbeute 85% d.Th. Sdp.$_{20}$ 125°

$C_{12}H_{17}N$ (175,3) Ber.: C 82,23 H 9,77 N 7,99

Gef.: C 82,00 H 9,20 N 7,60

11. 3-Methyl-butyl-benzyliden-amin (113)

Ausbeute 87% d.Th. Sdp.$_{13}$ 115°

$C_{12}H_{17}N$ (175,3)

12. Hexyl-benzyliden-amin (114)

Ausbeute 85% d.Th. Sdp.$_{13}$ 135°

$C_{13}H_{19}N$ (189,3)

13. 1,3-Dimethyl-butyl-benzyliden-amin (115)

Ausbeute 85% d.Th. Sdp.$_{13}$ 130°

$C_{13}H_{19}N$ (189,3)

14. 1,2,2-Trimethyl-propyl-benzyliden-amin

Ausbeute 74% d.Th. Sdp.$_{16}$ 116°

$C_{13}H_{19}N$ (189,3) Ber.: C 82,48 H 10,12 N 7,40

Gef.: C 82,00 H 10,10 N 6,80

15. 1,2-Dimethyl-butyl-benzyliden-amin

Ausbeute 80% d.Th. Sdp.$_{17}$ 125°

$C_{13}H_{19}N$ (189,3) Ber.: C 82,48 H 10,12 N 7,40

Gef.: C 81,70 H 10,20 N 7,00

16. 4-Methyl-pentyl-benzyliden-amin (116)

Ausbeute 89% d.Th. Sdp.$_{18}$ 138°

$C_{13}H_{19}N$ (189,3)

B Ringsubstituierte Butyl-benzyliden-amine

17. Butyl-(2-methyl-benzyliden)-amin (117)

Ausbeute 92% d.Th. Sdp.$_{18}$ 130°

$C_{12}H_{17}N$ (175,3)

18. Butyl-(3-methyl-benzyliden)-amin (118)

Ausbeute 92% d.Th. Sdp.$_{12}$ 112°

$C_{12}H_{17}N$ (175,3)

19. Butyl-(4-methyl-benzyliden)-amin (27)

Ausbeute 92% d.Th. Sdp.$_{15}$ 130°

$C_{12}H_{17}N$ (175,3)

20. Butyl-(2-fluor-benzyliden)-amin

Ausbeute 85% d.Th. Sdp.$_{13}$ 103°

$C_{11}H_{14}FN$ (179,2) Ber.: C 73,73 H 7,87 F 10,60 N 7,81

Gef.: C 73,00 H 8,10 F 9,80 N 7,90

21. Butyl-(3-fluor-benzyliden)-amin

Ausbeute 68% d.Th. Sdp.$_{12}$ 110-2°

$C_{11}H_{14}FN$ (179,2) Ber.: C 73,73 H 7,87 F 10,60 N 7,81

Gef.: C 73,60 H 7,90 F 10,10 N 7,90

22. Butyl-(4-fluor-benzyliden)-amin

Ausbeute 87% d.Th. Sdp.$_{15}$ 111°

$C_{11}H_{14}FN$ (179,2) Ber.: C 73,73 H 7,87 F 10,60 N 7,81

Gef.: C 73,50 H 7,90 F 10,25 N 7,90

23. Butyl-(2-chlor-benzyliden)-amin (119)

Ausbeute 85% d.Th. Sdp.$_{12}$ 130°

$C_{11}H_{14}Cl\ N$ (195,7)

24. Butyl-(3-chlor-benzyliden)-amin (119)

Ausbeute 92% d.Th. Sdp.$_{16}$ 142-5°

$C_{11}H_{14}Cl\ N$ (195,7)

25. Butyl-(4-chlor-benzyliden)-amin (119)

Ausbeute 86% d.Th. Sdp.$_{12}$ 135°

$C_{11}H_{14}Cl\ N$ (195,7)

26. Butyl-(2-brom-benzyliden)-amin

Ausbeute 90% d.Th. Sdp.$_{18}$ 150°

$C_{11}H_{14}Br\ N$ (240,1) Ber.: C 55,02 H 5,87 Br 33,28 N 5,83

Gef.: C 54,90 H 5,30 Br 33,00 N 5,70

27. Butyl-(3-brom-benzyliden)-amin

Ausbeute 96% d.Th. Sdp.$_{13}$ 147-9°

$C_{11}H_{14}Br\ N$ (240,1) Ber.: C 55,02 H 5,87 Br 33,28 N 5,83

Gef.: C 54,90 H 5,86 Br 33,40 N 5,85

28. Butyl-(4-brom-benzyliden)-amin

Ausbeute 96% d.Th. Sdp.$_{12}$ 146°

$C_{11}H_{14}Br\ N$ (240,1) Ber.: C 55,02 H 5,87 Br 33,28 N 5,83

Gef.: C 55,30 H 6,10 Br 33,30 N 5,90

29. Butyl-(3-jod-benzyliden)-amin

Ausbeute 83% d.Th. Sdp.$_{12}$ 168°

$C_{11}H_{14}J\ N$ (287,1) Ber.: C 46,06 H 4,92 J 44,21 N 5,84

Gef.: C 45,95 H 4,90 J 44,10 N 5,90

2) Reduktion der Schiff'schen Basen

Syntheseweg a:

Die Synthese der N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamine(ÄDA) erfolgt durch Reduktion der nach 1) hergestellten Schiff'schen Basen mit aktiviertem Aluminium in Äthanol/Toluol(13,15,16).

1,5 g-Atom kleingeschnittenes Aluminium (Folie) und eine Lösung von 4g Quecksilber-II-chlorid in 100ml absolutem Äthanol werden auf dem Wasserbad erhitzt. Nach beginnender Wasserstoffentwicklung läßt man eine Lösung von 0,5 Mol Schiff'scher Base in 150ml absolutem Äthanol schnell zutropfen. Die Reaktionslösung wird am Rückfluß unter Rühren im Sieden gehalten und, sobald ihre Konsistenz durch Alkoholatbildung zu dickflüssig wird, portionsweise mit insgesamt 250ml Toluol verdünnt. Nach 2 Stunden weiteren Erhitzens ist die Reaktion beendet. Die entstandene Gallerte wird unter Rühren und Kühlen bis zu ihrer Auflösung mit 30 prozentiger Natronlauge versetzt. Die organische Phase wird abgetrennt und der Rückstand mehrfach mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Löungsmittel befreit. Anschließend wird das,in den meisten Fällen als Nebenprodukt anfallende, monomere Reduktionsprodukt N-Alkyl-benzylamin durch Hochvakuumdestillation abgetrennt. Man löst den Destillationsrückstand, der die diastereomeren ÄDA enthält, in Chloroform und leitet unter Eiskühlung bis zur Sättigung Chlorwasserstoff ein. Durch Abziehen des Chloroforms gewinnt man die N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochloride(ÄDAx2HCl). Die analytische Bestimmung der Diastereomeren erfolgt durch multiplikative Verteilung nach CRAIG(120).

Syntheseweg b, modifiziert nach (17):

0,01 Mol Benzpinakol und 0,02 Mol Schiff'sche Base werden in 150ml Isopropanol fünf Tage lang unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt, und der Rückstand im Feinvakuum destilliert.Dadurch lassen sich N-Alkyl-benzylamine und Benzophenon abtrennen. Der die diastereomeren ÄDA enthaltende Destillationsrückstand wird wie bei Syntheseweg a aufgearbeitet.

Eingesetzte Schiff'sche Basen: 6, 7, 8, 11, 29

Ausbeuteverhältnisse: Die Umsetzung erfolgt im Gegensatz zu Syntheseweg a nahezu Nebenprodukt frei, es entsteht sehr wenig Monomerprodukt (< 1%). Die Diastereomerenverhältnisse werden durch multiplikative Verteilung bestimmt; es entstehen äquimolekulare Mengen racem- und meso-ÄDA.

Die präparative Aufarbeitung der Diastereomerengemische erfolgt nach vier Verfahren:

Verfahren 1:

Meso-N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid(meso-ÄDAx 2HCl) und racem-N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid (racem-ÄDAx2HCl) werden durch fraktionierte Kristallisation in Methanol/Äther getrennt.

Verfahren 2:

Die diastereomeren ÄDAx2HCl werden in der Unterphase des Löungsmittelsystems 4*)(LS 4) heiß gelöst. Meso-ÄDAx2HCl kristallisiert aus; zur weiteren Reinigung wird in Methanol/bzw. Äthanol/Äther umkristallisiert. Zur Isolierung von racem-ÄDAx2HCl wird die Mutterlauge (Unterphase

*) Siehe Legende von Tabelle 1 B, Seite 15

von LS 4) eingeengt und der Rückstand in Methanol/ bzw. Äthanol/Äther umkristallisiert.

Verfahren 3:

Die diastereomeren ÄDAx2HCl werden durch präparative Craigverteilung getrennt(LS 4*), 24 Schritte, V_l/V_s= 75/50, Einwaage 3x2g in die Elemente 0-2). Racem-ÄDAx2HCl wird aus dem Abdampfrückstand der Unterphasen, Elemente 0-6, durch fraktionierte Kristallisation in Aceton gewonnen. Meso-ÄDA wird aus dem alkalisierten Inhalt der Elemente 18-24 mit Chloroform extrahiert und als Dihydrochlorid in Aceton umkristallisiert.

Verfahren 4:

Die diastereomeren Basen werden in wenig Äthanol gelöst und bei -18° gelagert. Nach 2-4 Wochen scheidet sich meso-ÄDA kristallin ab und wird als Dihydrochlorid erneut in Äthanol/Äther umkristallisiert. Racem-ÄDA wird aus dem Rückstand der Mutterlauge nach Überführung in das Dihydrochlorid durch fraktionierte Kristallisation in Äthanol/Äther gewonnen.

*) Siehe Legende von Tabelle 1B , Seite 15

A Reduktionsprodukte der ringunsubstituierten Alkyl-benzyliden-amine

Wenn keine anderen Angaben vorliegen, wurde nach Syntheseweg a reduziert. Die Ausbeuteberechnung erfolgte bis auf Verb. 1a und 1b für meso- und racem-ÄDA aus den Daten der analytischen Verteilung, bei allen monomeren Reduktionsprodukten (N-Alkyl-benzylamine) aus dem Ergebnis der Vakuumdestillation.

1 Methyl-benzyliden-amin

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 1

1a racem-N,N'-Dimethyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 30% d.Th.*) Schmp. 242° (Äthanol/Äther)

$C_{16}H_{20}N_2$ x 2HCl (313,3) Ber.: C 61,43 H 7,09 Cl 22,63 N 8,94

Gef.: C 61,90 H 7,15 Cl 22,55 N 8,85

1b meso-N,N'-Dimethyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 40% d.Th.*) Schmp. 304° (Äthanol/Äther)

$C_{16}H_{20}N_2$ x 2HCl (313 3) Ber.: C 61,43 H 7,09 Cl 22,63 N 8,94

Gef.: C 61,30 H 6,60 Cl 22,55 N 9,00

1c N-Methyl-benzylamin-hydrochlorid

Ausbeute 19% d.Th. Schmp. 205° (Äthanol/Äther)

Sdp.$_{Base\ 16}$ 76-7°

*) Ausbeuteberechnung durch quantitative NMR-Messung, Seite 121

2 Äthyl-benzyliden-amin (11)

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 1

2a racem-N,N'-Diäthyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 41% d.TH. Schmp. 155° (Äthanol/Äther)

$C_{18}H_{24}N_2$ x 2HCl (341,3) Ber.: C 63,35 H 7,58 Cl 20,77 N 8,21

Gef.: C 63,10 H 7,60 Cl 20,50 N 8,15

2b meso-N,N'-Diäthyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid (11)

Ausbeute 33% d.Th. Schmp. 238° (Äthanol/Äther)

$C_{18}H_{24}N_2$ x 2HCl (341,3) Ber.: C 63,35 H 7,58 Cl 20,77 N 8,21

Gef.: C 62,90 H 7,50 Cl 21,10 N 8,25

2c N-Äthyl-benzylamin-hydrochlorid (27)

Ausbeute 16% d.Th. Schmp. 184° (Äthanol/Äther)

Sdp.$_{Base}$ $_{12}$79-83°

3 Propyl-benzyliden-amin (121)

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 1

3a racem-N,N'-Dipropyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 31% d.Th. Schmp. 185° (Äthanol/Äther)

$C_{20}H_{28}N_2$ x 2HCl (369,4) Ber.: C 65,03 H 8,19 Cl 19,20 N 7,58

Gef.: C 65,10 H 8,20 Cl 19,05 N 7,60

3b meso-N,N'-Dipropyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid(121)

Ausbeute 40% d.Th. Schmp. 215° (Äthanol/Äther)

$C_{22}H_{28}N_2$ x 2HCl (369,4) Ber.: C 65,03 H 8,19 Cl 19,20 N 7,58

Gef.: C 65,10 H 8,10 Cl 19,30 N 7,65

3c N-Propyl-benzylamin-hydrochlorid (121)

Ausbeute 14% d.Th. Schmp. 184° (Äthanol/Äther)

$Sdp._{Base\ 12}$ 104-8°

4 Isopropyl-benzyliden-amin (121)

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 1

4a racem-N,N'-Diisopropyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 36% d.Th. Schmp. 241-5° (Äthanol/Äther)

$C_{22}H_{28}N_2$ x 2HCl (369,4) Ber.: C 65,03 H 8,19 Cl 19,20 N 7,58

Gef.: C 65,10 H 8,20 Cl 19,10 N 7,60

4b meso-N,N'-Diisopropyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 38% d.Th. Schmp. 260° (Äthanol/Äther)

$C_{22}H_{28}N_2$ x 2HCl (369,4) Ber.: C 65,03 H 8,19 Cl 19,20 N 7,58

Gef.: C 65,95 H 8,15 Cl 19,25 N 7,70

4c N-Isopropyl-benzylamin-hydrochlorid (121)

Ausbeute 16% d.Th. Schmp. 185°(Äthanol/Äther) $Sdp_{Base\ 0,15}$ 61-3°

5 Butyl-benzyliden-amin (121)

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 2

5a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid(121)

Ausbeute 32% d.Th. Schmp. 174-6° (Dioxan)

5b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid (121)

Ausbeute 41% d.Th. Schmp. 217-8° (Methanol)

5c N-Butyl-benzylamin-hydrochlorid (121)

Ausbeute 13% d.Th Schmp. 241° (Methanol/Äther)

Sdp.$_{Base\ 12}$ 115-8°

6 Isobutyl-benzyliden-amin (121)

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 2

6a racem-N,N'-Diisobutyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid (121)

Ausbeute 41% d.Th. Schmp. 202-3° (Äthanol/Äther)

6b meso-N,N'-Diisobutyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid (121)

Ausbeute 42% d.Th. Schmp. 226-8° (Äthanol/Äther)

6c N-Isobutyl-benzylamin-hydrochlorid (121)

Ausbeute 8% d.Th. Schmp. 180-1° (Äthanol/Äther)

Sdp.$_{Base}$ 0,1 48°

7 sek-Butyl-benzyliden-amin

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 2 oder 4

7a racem-N,N'-Di-sek-butyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 41% d.Th. Schmp. 226-8° (Äthanol/Äther)

$C_{22}H_{32}N_2$ x 2HCl (397,4) Ber.: C 66,49 H 8,62 Cl 17,84 N 7,05

Gef.: C 67,10 H 8,50 Cl 17,80 N 6,95

7b meso-N,N'-Di-sek-butyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 46% d.Th. Schmp. 236-8° (Äthanol/Äther)

$C_{22}H_{32}N_2$ x 2HCl (397,4) Ber.: C 66,49 H 8,62 Cl 17,84 N 7,05

Gef.: C 66,85 H 8,40 Cl 17,20 N 6,95

7c N-sek-Butyl-benzylamin-hydrochlorid

Ausbeute 4% d.Th. Schmp. 178° (Äthanol/Äther)

$C_{11}H_{17}N$ x HCl (199,7) Ber.: C 66,16 H 9,08 Cl 17,76 N 7,00

Sdp.$_{Base}$ 0,1 48-50° Gef.: C 66,05 H 9,00 Cl 17,65 N 6,90

8 tert-Butyl-benzyliden-amin (27)

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 2

8a racem-N,N'-Di-tert-butyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 38% d.Th. Schmp. 218-20° (Äthanol/Äther)

$C_{22}H_{32}N_2$ x 2HCl (397,4) Ber.: C 66,49 H 8,62 Cl 17,84 N 7,05

Gef.: C 67,00 H 8,75 Cl 17,20 N 6,60

8b meso-N,N'-Di-tert-butyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 46% d.Th. Schmp. 230-2° (Äthanol/Äther)

$C_{22}H_{32}N_2$ x 2HCl (397,4) Ber.: C 66,49 H 8,62 Cl 17,84 N 7,05

Gef.: C 66,80 H 8,35 Cl 17,60 N 7,00

8c N-tert-Butyl-benzylamin-hydrochlorid

Ausbeute 0%

9 Pentyl-benzyliden-amin (22)

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 2

9a racem-N,N'-Dipentyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 33% d.Th. Schmp. 189-91° (Äthanol/Äther)

$C_{24}H_{36}N_2$ x 2HCl (425,5) Ber.: C 67,75 H 9,00 Cl 16,66 N 6,58

Gef.: C 67,80 H 9,10 Cl 16,50 N 6,60

9b meso-N,N'-Dipentyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid(22)

Ausbeute 41% d.Th. Schmp. 203-5° (Äthanol/Äther)

$C_{24}H_{36}N_2$ x 2HCl (425,5) Ber.: C 67,75 H 9,00 Cl 16,66 N 6,58

Gef.: C 67,70 H 9,10 Cl 16,85 N 6,65

9c N-Pentyl-benzylamin-hydrochlorid (22)

Ausbeute 16% d.Th. Schmp. 237-8°

Sdp.Base 14 126-8°

10 2-Methyl-butyl-benzyliden-amin

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 2

10a **racem**-N,N'-Di-2-methyl-butyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 43% d.Th. Schmp. 178-82° (Äthanol/Äther)

$C_{24}H_{36}N_2$ x 2HCl (425,5) Ber.: C 67,75 H 9,00 Cl 16,66 N 6,58

Gef.: C 67,60 H 8,55 Cl 16,30 N 6,55

10b meso-N,N'-di-2-methyl-butyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 41% d.Th. Schmp. 185-6° (Äthanol/Äther)

$C_{24}H_{36}N_2$ x 2HCl (425,5) Ber.: C 67,75 H 9,00 Cl 16,66 N 6,58

Gef.: C 68,10 H 8,80 Cl 16,20 N 6,50

10c N-2-Methyl-butyl-benzylamin-hydrochlorid

Ausbeute 8% d.Th. Schmp. 153° (Äthanol/Äther)

$C_{12}H_{19}N$ x HCl (213,8) Ber.: C 67,44 H 9,43 Cl 16,59 N 6,56

Sdp.Base 0,1 59° Gef.: C 67,95 H 9,35 Cl 16,85 N 6,45

11 3-Methyl-butyl-benzyliden-amin

Aufarbeitung: meso-ÄDAx2HCl wird nach Verfahren 2 isoliert. Racem-ÄDA: die vereinigten Mutterlaugen aus Verfahren 2 werden etwas eingeengt und fünfmal mit dem gleichen Volumen Oberphase des LS 4*) ausgeschüttelt, zur Abtrennung von restlichem meso-ÄDA. Aus dem Abdampfrückstand der Unterphase läßt sich racem-ÄDA durch fraktionierte Kristallisation in Methanol/Äther gewinnen

11a racem-Di-3-methyl-butyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 44% d.Th. Schmp. 177-81° (Methanol/Äther)

$C_{24}H_{36}N_2$ x 2HCl (425,5) Ber.: C 67,75 H 9,00 Cl 16,66 N 6,58

Gef.: C 67,10 H 8,90 Cl 16,90 N 6,70

11b meso-N,N'-Di-3-methyl-butyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 40% d.Th. Schmp. 236-8° (Äthanol/Äther)

$C_{24}H_{36}N_2$ x 2HCl (425,5) Ber.: C 67,75 H 9,00 Cl 16,66 N 6,58

Gef.: C 67,70 H 9,10 Cl 16,85 N 6,40

*) Siehe Legende von Tabelle 1 B, Seite 15

11c N-3-Methyl-butyl-benzylamin-hydrochlorid

Ausbeute 16% d.Th. Schmp. 195° (Äthanol/Äther)

$C_{12}H_{19}N$ x HCl (213,8) Ber.: C 67,43 H 9,43 Cl 16,59 N 6,56

Sdp.$_{Base}$ $0,15^{60-3°}$ Gef.: C 68,65 H 9,40 Cl 16,45 N 6,50

12 Hexyl-benzyliden-amin (22)

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 2

12a racem-N,N'-Dihexyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 66% d.Th.(racem+meso)*) Schmp. 142-3°(Äthanol/Äther)

bzw. 20% nach Verfahren 2

$C_{26}H_{40}N_2$ x 2HCl (453,5) Ber.: C 68,86 H 9,33 Cl 15,63 N 6,18

Gef.: C 69,10 H 9,25 Cl 15,40 N 6,15

12b meso-N,N'-Dihexyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 66% d.Th.(racem+meso)*) Schmp. 82°(Äthanol/Äther)

bzw. 25% nach Verfahren 2

$C_{26}H_{40}N_2$ x 2HCl (453,5) Ber.: C 68,86 H 9,33 Cl 15,63 N 6,18

Gef.: C 68,65 H 9,45 Cl 15,20 N 6,00

12c N-Hexyl-benzylamin-hydrochlorid (22)

Ausbeute 29% d.Th. Schmp. 218-20° (Äthanol/Äther)

Sdp.$_{Base}$ $0,3^{100°}$

*) durch analytische Verteilung keine Trennung

13 1,3-Dimethyl-butyl-benzyliden-amin

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 2

13a racem-N,N'-Di-1,3-dimethyl-butyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 44% d.Th. Schmp. 177-81° (Äthanol/Äther)

$C_{26}H_{40}N_2$ x 2HCl (453,5) Ber.: C 68,86 H 9,33 Cl 15,63 N 6,18

Gef.: C 68,60 H 9,35 Cl 15,35 N 6,25

13b meso-N,N'-Di-1,3-dimethyl-butyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 39% d.Th. Schmp. 170-2° (Äthanol/Äther)

$C_{26}H_{40}N_2$ x 2HCl (453,5) Ber.: C 68,86 H 9,33 Cl 15,63 N 6,18

Gef.: C 68,40 H 9,30 Cl 15,05 N 6,20

13c N-1,3-Dimethyl-butyl-benzylamin-hydrochlorid

Ausbeute 2% d.Th. Schmp. 146-9° (Äthanol/Äther)

$C_{13}H_{21}N$ x HCl (227,8) Ber.: C 68,54 H 9,74 Cl 15,57 N 6,15

Sdp.Base $0,2^{69°}$ Gef.: C 68,30 H 9,95 Cl 15,40 N 6,35

14 1,2,2-Trimethyl-propyl-benzyliden-amin

Aufarbeitung: meso- und racem-ÄDAx2HCl werden vor der präparativen Verteilung nach Verfahren 3 durch fraktionierte Kristallisation in Chloroform/Ligroin angereichert und dann getrennt verteilt. Meso-ÄDAx2HCl fällt zuerst aus.

14a racem-N,N'-Di-1,2,2-trimethyl-propyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 42% d.Th. Schmp. 188-90° (Äthanol/Äther)

$C_{26}H_{40}N_2$ x 2HCl (453,5) Ber.: C 68,86 H 9,33 N 6,18

Gef.: C 68,40 H 9,10 N 6,20

14b meso-N,N'-Di-1,2,2-trimethyl-propyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 44% d.Th. Schmp. 202-4° (Äthanol)

$C_{26}H_{40}N_2$ x 2HCl (453,5) Ber.: C 68,86 H 9,33 N 6,18

Gef.: C 68,80 H 9,85 N 5,95

14c N-1,2,2-Trimethyl-propyl-benzylamin-hydrochlorid

Ausbeute 0,5% d.Th. Schmp. 182-4° (Aceton)

$C_{13}H_{21}N$ x HCl (227,8) Ber.: C 68,54 H 9,74 Cl 15,57 N 6,15

Sdp.$_{Base}$ 0,7 71° Gef.: C 68,30 H 9,30 Cl 15,70 N 5,70

15 1,2-Dimethyl-butyl-benzyliden-amin

Keine Auftrennung von meso- und racem-ÄDA möglich

15ab N,N'-Di-1,2-dimethyl-butyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 70% d.Th. Schmp. 178-80° (Äthanol/Äther)

$C_{26}H_{40}N_2$ x 2HCl (453,5) Ber.: C 68,86 H 9,33 N 6,18

Gef.: C 69,00 H 9,25 N 6,05

15c N-1,2-Dimethyl-butyl-benzylamin-hydrochlorid

Ausbeute 1% d.Th. Schmp. 142°(Äthanol/Äther)

$C_{13}H_{21}N$ x HCl (227,8) Ber.: C 68,54 H 9,74 Cl 15,57 N 6,15

Gef.: C 68,30 H 9,60 Cl 15,85 N 5,80

16 4-Methyl-pentyl-benzyliden-amin

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 2, Lösungsmittel der Zweitkristallisation jeweils Aceton

16a racem-N,N'-Di-4-methyl-pentyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 39% d.Th. Schmp. 170-5° (Aceton)

$C_{26}H_{40}N_2$ x 2HCl (453,5) Ber.: C 68,86 H 9,33 Cl 15,63 N 6,18

Gef.: C 69,20 H 9,35 Cl 15,40 N 6,20

16b meso-N,N'-Di-4-methyl-pentyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 26% d.Th. Schmp. 198-203°(Aceton)

$C_{26}H_{40}N_2$ x 2HCl (453,5) Ber.: C 68,86 H 9,33 Cl 15,63 N 6,18

Gef.: C 68,80 H 9,30 Cl 15,50 N 6,10

16c N-4-Methyl-pentyl-benzylamin-hydrochlorid

Ausbeute 20% d.Th. Schmp. 199° (Methanol/Aceton)

$C_{13}H_{21}N$ x HCl (227,8) Ber.: C 68,54 H 9,74 Cl 15,57 N 6,15

Sdp.$_{Base}$ 0,3 89° Gef.: C 68,60 H 9,65 Cl 15,60 N 6,00

B Reduktionsprodukte der ringsubstituierten Butyl-benzyliden-amine

17 Butyl-(2-methyl-benzyliden)-amin

Aufarbeitung nach Verfahren 1, racem-ÄDAx2HCl fällt in Methanol zuerst aus.

17a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(2-methyl-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 31% d.Th. Schmp. 181-3°(Äthanol)

$C_{24}H_{36}N_2$ x 2HCl (425,5) Ber.: C 67,75 H 9,00 Cl 16,66 N 6,58

Gef.: C 68,10 H 8,80 Cl 16,55 N 6,55

17b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(2-methyl-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 29% d.Th. Schmp. 187-8°((Aceton/Äther)

$C_{24}H_{36}N_2$ x 2HCl (425,5) Ber.: C 67,75 H 9,00 Cl 16,66 N 6,58

Gef.: C 67,90 H 8,90 Cl 16,05 N 6,70

17c N-Butyl-(2-methyl-benzyl)amin-hydrochlorid

Ausbeute 37% d.Th. Schmp. 183° (Äthanol/Äther)

$C_{12}H_{19}N$ x HCl (213,8) Ber.: C 67,44 H 9,43 Cl 16,58 N 6,55

Sdp.$_{Base\ 0,3}$ 84° Gef.: C 68,10 H 9,35 Cl 16,50 N 6,45

18 Butyl-(3-methyl-benzyliden)-amin

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 2

18a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(3-methyl-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 28% d.Th. Schmp. 164-6° (Äthanol)

$C_{24}H_{36}N_2$ x 2HCl (425,5) Ber.: C 67,75 H 9,00 Cl 16,66 N 6,58

Gef.: C 67,75 H 9,40 Cl 16,60 N 6,55

18b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(3-methyl-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 32% d.Th. Schmp. 114-6° (Aceton/Äther)

$C_{24}H_{36}N_2$ x 2HCl (425,5) Ber.: C 67,75 H 9,00 Cl 16,66 N 6,58

Gef.: C 67,75 H 9,20 Cl 16,26 N 6,15

18c N-Butyl-(3-methyl-benzyl)amin-hydrochlorid

Ausbeute 32% d.Th. Schmp. 205° (Äthanol/Äther)

$C_{12}H_{19}N$ x HCl (213,8) Ber.: C 67,44 H 9,43 Cl 16,58 N 6,55

Sdp.$_{Base}$ 0,3 88° Gef.: C 67,70 H 9,35 Cl 16,60 N 6,55

19 Butyl-(4-methyl-benzyliden)-amin (27)

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 2

19a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4-methyl-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 43% d.Th. Schmp. 200-2° (Aceton/Äther)

$C_{24}H_{36}N_2$ x 2HCl (425,5) Ber.: C 67,75 H 9,00 Cl 16,66 N 6,58

Gef.: C 67,90 H 8,60 Cl 16,50 N 6,55

19b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4-methyl-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 38% d.Th. Schmp. 210-2° (Äthanol/Ligroin)

$C_{24}H_{36}N_2$ x 2HCl (425,4) Ber.: C 67,75 H 9,00 Cl 16,66 N 6,58

Gef.: C 67,50 H 8,40 Cl 16,40 N 6,40

19c N-Butyl-(4-methyl-benzyl)amin-hydrochlorid

Ausbeute 20% d.Th. Schmp. 188-92° (Äthanol/Äther)

$C_{12}H_{29}N$ x HCl (213,8) Ber.: C 67,44 H 9,43 Cl 16,58 N 6,55

Sdp.$_{Base}$ 0,3 80-3° Gef.: C 68,20 H 9,35 Cl 16,60 N 6,65

20 Butyl-(2-fluor-benzyliden)-amin

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 3 oder 4

20a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(2-fluor-phenyl)-äthylendiamin-hydrochlorid

Ausbeute 36% d.Th. Schmp. 172-4° (Aceton)

$C_{22}H_{30}F_2N_2$x 2HCl (433,4) Ber.: C 60,97 H 7,44 Cl 16,36 N 6,46

Gef.: C 61,10 H 7,20 Cl 16,25 N 6,45

20b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(2-fluor-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 34% d.Th. Schmp. 176-8° (Aceton)

$C_{22}H_{30}F_2N_2$x 2HCl (433,4) Ber.: C 60,97 H 7,44 Cl 16,36 N 6,46

Gef.: C 61,35 H 7,10 Cl 16,35 N 6,55

20c N-Butyl-(2-fluor-benzyl)amin-hydrochlorid

Ausbeute 16% d.Th. Schmp. 164-6° (Äthanol)

$C_{11}H_{16}F\ N \times HCl$ (217,7) Ber.: C 60,70 H 7,88 Cl 16,28 N 6,40

Sdp.$_{Base}$ 0,1 62-5° Gef.: C 60,90 H 7,30 Cl 16,35 N 6,60

21 Butyl-(3-fluor-benzyliden)-amin

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 2

21a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(3-fluor-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 36% d.Th. Schmp. 178° (Äthanol/Äther)

$C_{22}H_{30}F_2N_2 \times 2HCl$ (433,4) Ber.: C 60,97 H 7,44 Cl 16,36 N 6,46

Gef.: C 60,45 H 7,35 Cl 16,40 N 6,70

21b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(3-fluor-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 38% d.Th. Schmp. 195° (Äthanol/Äther)

$C_{22}H_{30}F_2N_2 \times 2HCl$ (433,4) Ber.: C 60.97 H 7,44 Cl 16,36 N 6,46

Gef.: C 60,10 H 7,20 Cl 16,00 N 6,10

21c N-Butyl-(3-fluor-benzyl)amin-hydrochlorid

Ausbeute 18% d.Th. Schmp. 170° (Äthanol/Äther)

$C_{11}H_{16}F\ N \times HCl$ (217,7) Ber.: C 60,70 H 7,88 Cl 16,28 N 6,40

Sdp.$_{Base}$ 0,3 75-8° Gef.: C 60,50 H 7,70 Cl 16,30 N 6,30

22 Butyl-(4-fluor-benzyliden)-amin

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 2 für meso-ÄDA, nach Verfahren 3 für racem-ÄDA(Gefäße 0-7).

22a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4-fluor-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 40% d.Th. Schmp. 120-2° (Aceton)

$C_{22}H_{30}F_2N_2$ x 2HCl (433,4) Ber.: C 60,97 H 7,44 Cl 16,36 N 6,46

Gef.: C 61,50 H 7,10 Cl 16,20 N 5,85

22b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4-fluor-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 37% d.Th. Schmp. 208-9° (Aceton)

$C_{22}H_{30}F_2N_2$ x 2HCl (433,4) Ber.: C 60,97 H 7,44 Cl 16,36 N 6,46

Gef.: C 60,05 H 6,80 Cl 16,10 N 6,42

22c N-Butyl-(4-fluor-benzyl)amin-hydrochlorid

Ausbeute 20% d.Th. Schmp. 190-2° (Äthanol)

$C_{11}H_{16}F$ N x HCl (217,7) Ber.: C 60,70 H 7 88 Cl 16,28 N 6,40

Sdp.$_{Base}$ 0,2 61° Gef.: C 59,65 H 7,00 Cl 16,20 N 6,45

23 Butyl-(2-chlor-benzyliden)-amin (27)

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 2

23a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(2-chlor-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 40% d.Th. Schmp. 175° Äthanol/Äther)

$C_{22}H_{30}Cl_2N_2$x 2HCl (466,3) Ber.: C 56,66 H 6,92 Cl 30,41 N 6,01

Gef.: C 56,65 H 6,85 Cl 29,70 N 6,25

23b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(2-chlor-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 37% d.Th. Schmp. 195° (Methanol/Äther)

$C_{22}H_{30}Cl_2N_2$x 2HCl (466,3) Ber.: C 56,66 H 6,92 Cl 30,41 N 6,01

Gef.: C 56,40 H 6,75 Cl 29,95 N 6,25

23c N-Butyl-(2-chlor-benzyl)amin-hydrochlorid (27)

Ausbeute 16% d. Th. Schmp. 228° (Methanol/Äther)

Sdp.$_{Base\ 26}$ 145-7°

24 Butyl-(3-chlor-benzyliden)-amin (27)

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 2, racem-ÄDA fällt zuerst aus

24a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(3-chlor-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 32% d.Th. Schmp. 188-90° (Methanol/Äther)

$C_{22}H_{30}Cl_2N_2$x 2HCl (466,3) Ber.: C 56,66 H 6,92 Cl 30,41 N 6,01

Gef.: C 57,05 H 6,75 Cl 29,95 N 6,15

24b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(3-chlor-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 32% d.Th. Schmp. 200° Äthanol/Äther)

$C_{22}H_{30}Cl_2N_2$x 2HCl (466,3) Ber.: C 56,66 H 6,92 Cl 30,41 N 6,01

Gef.: C 56,85 H 7,05 Cl 30,00 N 6,15

24c N-Butyl-(3-chlorbenzyl)amin-hydrochlorid (27)

Ausbeute 27% d.Th. Schmp. 242° (Äthanol/Äther)

Sdp.$_{Base\ 0,4}$ 107-9°

25 Butyl-(4-chlor-benzyliden)-amin (27)

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 1, Methanol ist Lösungsmittel für die fraktionierte Kristallisation von meso-ÄDAx2HCl

25a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4-chlor-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 42% d.Th. Schmp. 141-3° (Äthanol)

$C_{22}H_{30}Cl_2N_2$x 2HCl (466,3) Ber.: C 56,66 H 6,92 Cl 30,41 N 6,01

Gef.: C 56,75 H 6,70 Cl 30,00 N 6,10

25b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4-chlor-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 40% d.Th. Schmp. 219-21° (Methanol/Äther)

$C_{22}H_{30}Cl_2N_2$x 2HCl (466,3) Ber.: C 56,66 H 6,92 Cl 30,41 N 6,01

gef.: C 56,90 H 6,85 Cl 29,85 N 6,15

25c N-Butyl-(4-chlor-benzyl)amin-hydrochlorid (27)

Ausbeute 9% d.Th. Schmp. 246° (Methanol/Äther)

Sdp.$_{Base}$ 0,2 105°

26 Butyl-(2-brom-benzyliden)-amin

Aufgrund der Untersuchungen in LS 1-4*) besteht das Reduktionsprodukt aus einem Vielkomponentengemisch, aus dem sich nach Verfahren 1-4 weder racem- noch meso-ÄDA isolieren lassen.
Das abdestillierte, anhand der NMR-Daten als "Monomeres" anzusprechende Produkt enthält kein Brom mehr.

27 Butyl-(3-brom-benzyliden)-amin

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 4

27a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(3-brom-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 39% d.Th. Schmp. 163° (Äthanol/Äther)

$C_{22}H_{30}Br_2N_2$x 2HCl (555,2)

Ber.: C 47,59 H 5,81 Br 28,78 Cl 12,77 N 5,05

Gef.: C 47,40 H 5,60 Br 28,70 Cl 13,00 N 4,90

27b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(3-brom-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 33% d.Th. Schmp. 175° (Äthanol/Äther)

$C_{22}H_{30}Br_2N_2$x 2HCl (555,2)

Ber.: C 47,59 H 5,81 Br 28,78 Cl 12,77 N 5,05

Gef.: C 47,80 H 6,10 Br 28,70 Cl 12,70 N 5,20

27c N-Butyl-(3-brom-benzyl)amin-hydrochlorid

Ausbeute 21% d.Th. Schmp. 175° (Äthanol/Äther)

$C_{11}H_{16}Br\,N \times HCl$ (278,6) Sdp.$_{Base}$ 0,1 93°

Ber.: C 47,43 H 6,15 Br 28,68 Cl 12,73 N 5,03

Gef.: C 47,55 H 6,25 Br 28,50 Cl 12,70 N 5,30

28 Butyl-(4-brom-benzyliden)-amin

Präparative Aufarbeitung nach Verfahren 2 für meso-ÄDA; racem-ÄDA kristallisiert nach 4 Wochen aus der Mutterlauge bei -18°C und wird aus Aceton umkristallisiert.

28a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4-brom-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 36% d.Th. Schmp. 140-3° (Aceton)

$C_{22}H_{30}Br_2N_2 \times 2HCl$ (555,2)

Ber.: C 47,59 H 5,81 Br 28,78 Cl 12,77 N 5,05

Gef.: C 47,85 H 5,65 Br 28,95 Cl 13,20 N 4,85

28b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4-brom-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 31% d.Th. Schmp. 190-2° (Aceton)

$C_{22}H_{30}Br_2N_2 \times 2HCl$ (555,2)

Ber.: C 47,59 H 5,81 Br 28,78 Cl 12,77 N 5,05

Gef.: C 47,55 H 5,70 Br 29,15 Cl 13,10 N 4,85

28c N-Butyl-(4-brom-benzyl)-amin-hydrochlorid

Ausbeute 13% d.Th. Schmp. 224-6° (Äthanol)

$C_{11}H_{16}Br\ N \times HCl$ (278,6) Sdp.$_{Base\ 0,4}$ 110-5°

Ber.: C 47,43 H 6,15 Br 28,68 Cl 12,73 N 6,15

Gef.: C 47,40 H 6,10 Br 29,00 Cl 12,70 N 5,90

29 Butyl-(3-jod-benzyliden)-amin

Herstellung nach Syntheseweg b; das Verteilungsverhalten der Reduktionsprodukte bei der Dünnschichtchromatographie und der analytischen Verteilung gibt Hinweise auf das Vorhandensein von racem-ÄDA, dieses läßt sich aber aus der Mutterlauge mit den angewandten Methoden nicht von den zahlreichen Nebenprodukten abtrennen. Bei der präparativen Aufarbeitung nach Verfahren 1 läßt sich nur meso-ÄDA isolieren(aus Methanol).

29b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(3-jod-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

Ausbeute 30% d.Th.(Verf.1) Schmp. 195° (Äthanol/Äther)

$C_{22}H_{30}J_2N_2 \times 2HCl$ (749,2)

Ber.: C 35,27 H 4,31 J 47,22 Cl 9,46 N 3,74

Gef.: C 35,10 H 4,20 J 46,80 Cl 9,50 N 3,80

29c N-Butyl-(3-jod-benzyl)-amin-hydrochlorid

Ausbeute 21% d.Th. Schmp. 180° (Äthanol/Äther)

$C_{11}H_{16}J\ N \times HCl$ (325,6) Sdp.$_{Base\ 0,1}$ 101°

Ber.: C 40,58 H 5,26 J 38,97 Cl 10,89 N 4,30

Gef.: C 40,70 H 5,30 J 38,80 Cl 10,80 N 4,45

3) Multiplikative Verteilung der Reaktionsgemische

Nach Abdestillieren des N-Alkyl-benzylamins wurden 300mg des Destillationsrückstandes(Hydrochloride) in einer 24stufigen Apparatur nach HECKER(29) verteilt.Das Volumenverhältnis Oberphase/Unterphase betrug 16/11 oder 16/10ml. Es wurden fünf Lösungsmittelsysteme verwendet:

LS 1: Chloroform/Methanol/2%ige Salzsäure
2000 : 600 : 1400 ml

LS 2: Chloroform/Methanol/0,36%ige Salzsäure
2000 : 200 : 1800 ml

LS 3: Chloroform/Methanol/3,6 %ige Salzsäure
2000 : 200 : 1800 ml

LS 4: Chloroform/Ligroin/Methanol/3,2%ige Salzsäure
1400 : 700 : 100 : 2000 ml

LS 5: Chloroform/Methanol/Phosphat-Citratpuffer pH 5,5(Mac-Ilvain)
2000 : 600 : 1400 ml

LS 5 wurde nur für die Verteilung des Reduktionsproduktes von 2 über 100 Verteilungsschritte in einer automatischen Batterie nach v.METSCH (122) verwendet.

Der Gehalt der einzelnen Elemente wurde in allen Fällen aminometrisch durch Titration mit 0,01n p-Toluolsulfonsäure in chloroformischen Lösungen(Dimethylaminoazobenzol als Indikator), nach einer von DIETZEL und PAUL(123) angegebenen Methode, bestimmt.

4) NMR-Messungen

Die Spektren der ÄDAx2HCl wurden in 10prozentigen Lösungen mit dem Varian-T-60-Spectrometer aufgenommen.

Für die quantitative Bestimmung der Ausbeuteverhältnisse von racem- zu meso-ÄDA bei 1 wurde mit den Reinsubstanzen 1a und 1b in den Mischungsverhältnissen 1a/1b 20/80, 40/60, 60/40 und 80/20 Vergleichsspektren aufgenommen(in D_2O). Aus dem Integralverhältnis der N-Methyl-Protonen(1a N-CH_3: = 7,34(s); 1b N-CH_3: = 7,63(s)) wurde eine Eichkurve angelegt*). Mit dem nach Syntheseweg a hergestellten Diastereomerengemisch(Dihydrochloride) wurde nach Abdestillieren des Monomerproduktes unter gleichen Bedingungen ein Spektrum in D_2O aufgenommen, und anhand der Eichkurve das Ausbeuteverhältnis bestimmt.

*) Die Eichkurve stellte freundlicherweise Herr STRANSKY zur Verfügung.

5) Bestimmung der hRF-Werte

Fließmittel(FS) 1: Äthylacetat/Chloroform/Ligroin/Eisessig

50 : 15 : 20 : 30

Fließmittel 2: Benzol/Methanol

90 : 10

Laufstrecke : 15 cm

Trägermaterial : DC-Fertigplatten der Fa.MERCK, Kieselgel HF_{254}

Detektionsmittel : Jod/Jod-Kali-Löung, UV_{254}

6) Schmelzpunkte

Die Bestimmung erfolgte mit dem Kofler-Heiztischmikroskop der Fa. REICHERT, sämtliche Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

II. Prüfung der N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamine auf tumorhemmende Wirkung

1) Bestimmung der akuten Toxizität

Als Versuchstiere dienten männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von 180-250g.

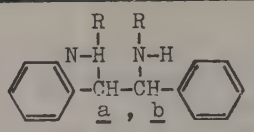
Die Bestimmung der mittleren letalen Dosis DL_{50} erfolgte bei den Verb. 1a, 2a, 2b, 3a und 4a durch einmalige orale Applikation mit der Schlundsonde; als Lösungsmittel diente eine wässerige Lösung, die 0,6% Methylzellulose(MH 2000) und 0,9% Natriumchlorid enthielt. Die Verb. wurden in 0,01-0,5 molaren Konzentrationen zu dieser Lösung gegeben. Die Herstellung erfolgte unmittelbar vor der Applikation.

Die Tiere wurden 3 Wochen lang beobachtet und bei Spontantod sofort seziert, um andere Todesursachen wie Verletzungen auszuschließen.

Die DL_{50} wurde jeweils aus der Regressionsgeraden im Wahrscheinlichkeitsnetz ermittelt(124)(Ergebnisse in Tabelle 11)

Die Verb. 1b, 3b und 4b und alle anderen zu prüfenden Verbindugen bewirkten in Vorversuchen in Dosen von ca. 2000mg keine toxischen Erscheinungen. Daher wurde auf eine exakte Toxizitätsbestimmung verzichtet.

Tabelle 11: Bestimmung der akuten Toxizität



x 2 HCl

a = racem

b = meso

Verb. Nr.	R	Zubereitung*	DL_{50} in mg	Vertrauensbereich ($p < 0,05$)
1a	CH_3	WL	400	355-445
1b	CH_3	WS	>2000	-
2a	C_2H_5	WL	280	260-300
2b	C_2H_5	WL	940	800-1100
3a	n-C_3H_7	WL	650	550-770
3b	n-C_3H_7	WS	>2000	-
4a	iso-C_3H_7	WL	202	185-220
4b	iso-C_3H_7	WS	>2000	-

* WL = wässerige Lösung

WS = wässerige Suspension

2) Die Erzeugung von Mammatumoren bei SD-Ratten mit DMBA

a) Induktion

Bei allen Versuchen wurden weibl. Sprague-Dawley-Ratten aus eigener Zucht verwendet. Zur Induktion von Mammatumoren mit 7,12-Dimethylbenz(a)anthracen nach HUGGINS(125) kamen 3 Verfahren zur Anwendung:

I) Am 50. Tag nach der Geburt werden jedem Tier 1 x 20mg (2.+3.Serie) bzw. 15mg (4.Serie) in Erdnußöl gelöstes 7,12-Dimethyl-benz-(a)anthracen(DMBA) oral mit einer Metallschlundsonde von 10cm Länge verabreicht.

II) Am 50., 53. und 56. Tag nach der Geburt werden jeweils 2mg DMBA, gelöst in 0,4ml einer injizierbaren Öl-inWasser-Emulsion nach SCHURR(126) in die Schwanzvene gespritzt.

III) Am 50., 53. und 56. Tag nach der Geburt werden jeweils 2mg DMBA, gelöst in 0,05ml Dimethylsulfoxid, in die Schwanzvene gespritzt(79).

b) Tumorausbeuten

Die Tumorausbeuten der ersten vier Versuchsserien sind zum Vergleich der drei Induktionsarten in Tabelle 12 aufgeführt, die Tumorausbeuten der anderen Serien in Tabelle 13.

Tabelle 12: Ausbeuten an tumortragenden Tieren beim Vergleich der Induktionarten I, II und III

	Appl.-Art*	1.Serie	2.Serie	3.Serie	4.Serie
Zahl der induzierten Tiere	I	-	102(20mg)	115(20mg)	132(15mg)
	II	170	-	-	-
	III	-	-	-	120
überlebende Tiere	I	-	89/87%	92/80%	92/70%
	II	155/91%	78/84%	-	-
	III	-	-	-	70/59%
tumortragende Tiere	I	-	34/35%	36/31%	27/20%
	II	30/18%	24/30%	-	-
	III	-	-	-	43/36%
behandlungsfähige Tumortiere(TT)	I	-	29/28%	21/18%	20/15%
	II	27/16%	18/22%	-	-
	III	-	-	-	35/31%
behandlungsfäh. TT, bezogen auf überlebende T.	I	-	29/33%	21/24%	20/22%
	II	27/16%	18/34%	-	-
	III	-	-	-	35/50%

* I, II, III siehe Text Seite 125

Tabelle 13: Ausbeuten an tumortragenden Tieren mit Induktionsart III (3x2mg DMBA gelöst in 0,05 ml DMSO)

	5.Serie	6.Serie	7.Serie	8.Serie	9.Serie	10.Serie
Zahl der induzierten Tiere	228	229	190	192	368	279
überlebende Tiere(Zahl/Prozent)	198/85	199/87	161/85	173/90	337/92	265/95
tumortragende Tiere	132/54	102/45	115/65	96/50	166/45	158/57
behandlunsfähige Tumortiere(=TT)	95/42	75/33	95/50	93/48	145/40	156/56
behandlungsfähige TT bez.auf überleb.T.	95/48	75/38	95/59	93/54	145/49	156/59

c) Tumormessung und Datenerfassung

Ab dem 40. Tag nach der Tumorinduktion wurden die Tiere einmal wöchentlich auf neu auftretende Tumoren perkutan abgetastet. Die zwischen dem 50. und 120. Tag(40) nach der Induktion erscheinenden Tumoren wurden für die Therapie verwendet, sobald sie eine angenäherte Mindestfläche von 100 mm^2 pro Tier erreicht hatten. Die Tumorfläche wurde nach MÜCKTER(39) ermittelt, und ergab sich als Produkt aus dem, mit einer modifizierten Schublehre gemessenen, größten und kleinsten Durchmesser eines perkutan tastbaren Tumors.

Bei den therapiegeeigneten Tieren wurden neben der dreimal wöchentlichen Tumorflächenmessung genauso oft das Tiergewicht bestimmt, in späteren Versuchen auch der Futterverbrauch und die Trinkwasseraufnahme durch Rückwägung bzw. Rückmessung. Die Tiere wurden zu fünft in Edelstahlkäfigen mit Laufrosten gehalten und erhielten Altromin R als Futter und Trinkwasser ad libitum.

3) Therapieschema der Vorversuche

Die behandlungsfähigen Tumortiere wurden in Fünfergruppen mit ungefähr gleicher, durchschnittlicher Tumorfläche(ca.1100mm^2) eingeteilt. Sie erhielten von allen Substanzen mit einer $DL_{50} > 2000$mg/kg 3 x 10^{-3}Mol/kg Körpergewicht, in der ersten Versuchswoche im Abstand von 48 Stunden,subkutan als wässerige, 0,5molare Suspensionen. Von den Substanzen mit kleinerer DL_{50} wurde entsprechend weniger(Daten in Tab. 3, Legende auf Seite 39) als Suspension oder Lösung verabreicht. Jeder Versuch dauerte 3 Wochen, danach wurden die Tiere getötet.

Bereitung der Suspensionen:

Die Substanzen wurden im Porzellanmörser fein verrieben und in Anteilen unter Rühren mit einer 0,9% Natriumchlorid/ 0,6% Methylzellulose (MH 2000 HÖCHST) enthaltenden Lösung versetzt. Die Grobsuspension wurde anschließend 5 Minuten lang unter Eiskühlung mit Ultraschall (Gerät: MSE Ultrasonic Disintigrator Nr.7100) behandelt. Die Beschallung wurde bei sich allmählich absetzenden Suspensionen vor jeder Tierbehandlung wiederholt.

Die Verb. 13a, 16a, 19a, 28a und 29b waren mit diesem Suspensionsmittel unverträglich. Hier wurde stattdessen eine wässerige, 0,9% Natriumchlorid und 5% Polyvinylalkohol(Mowiol N 50-88 HÖCHST) enthaltende Lösung als Suspensionsmittel verwendet. Das Herstellungsverfahren der 0,5molaren Suspensionen war analog dem der Methylzellulose-Zubereitung.

4) Therapieschema der Hauptversuche

Je 10 behandlungsfähige Tumortiere mit ungefähr gleicher Gesamttumorfläche(ca.2100mm^2) bildeten eine Behandlungsgruppe und wurden aus Platzgründen, jeweils zufällig, auf zwei Fünferkäfige verteilt.

a) Applikation im Futter

Die Verb. 7a, 7b, 11a, 11b, 17a, 17b, 23a und 23b wurden in Konzentrationen zwischen 0,21 und 0,38% mit Altromin R zu Pellets verpreßt.*) Außerdem wurden von 4a(DL_{50}200mg) 0,02prozentige Altrominpellets hergestellt.

Die Versuchsdauer und Fütterungszeit betrug 3 Wochen. 10 Kontrolltiere erhielten Placebopellets, alle Tiere Trinkwasser ad libitum. Das Futter wurde dreimal wöchentlich unter Rückwägung erneuert. Auf den Käfigrosten befindliches Futter wurde wegen der Verunreinigung durch Kot und Urin nach der Wägung verworfen. Zur Verringerung des Futterverlustes durch Verbeißen und Vertragen befanden sich in den Käfigen unter den Futterkörben rechteckige Auffangbleche(nach KNAPPEN et al. (127)). Wir ereichten dadurch eien Rückgang des Futterverlustes von ca. 20 auf ca. 5%.

Aus den Verb. 23a und 23b wurden von Herrn EGGINGER(90) Mikrokapseln hergestellt, die in Konzentrationen von 0,1%(23a) und 0,1 bzw.0,05% (23b) zu Altrominpellets verarbeitet*)wurden. 10 Versuchstiere wurden

*) Wir danken den Herren Dr.K.H.BAUER und Dr.R.RUPP von der Abt.für Pharmazeutische Technologie der Farbenfabriken BAYER für die Herstellung der Pellets.

drei Wochen ad libitum gefüttert und anschließend noch drei Wochen beobachtet. 10 Kontrolltiere erhielten Placebopellets.

b) Orale Applikation in Milch

Die ÄDAx2HCl 7a, 7b, 11a, 11b, 12a, 17a, 17b, 23a und 24b wurden in ihre öligen Basen überführt und zu ca. 10% in Erdnußöl gelöst. Aus 6% Saccharose, 10% Trockenmagermilch(Molico^{R}) und auf 50°C erwärmtem Leitungswasser wurde eine Milch hergestellt, aus der unter Zusatz von 0,5-1% substanzhaltigem Erdnußöl mit dem Ultraturrax eine stabile Emulsion bereitet wurde. Diese wurde in 250ml-Polyäthylentrinkflaschen abgefüllt und war bis zu 24 Stunden haltbar. Die Milch wurde täglich frisch bereitet.Die Arbeitsgefäße wurden vor Gebrauch jeweils im Trockenschrank sterilisiert und die Trinkflaschen mit 5%-Formaldehydlösung behandelt.

Die Tiere erhielten 3 Wochen lang täglich maximal je 50ml Milch und Altromin R ad libitum. Während der anschließenden dreiwöchigen Beobachtungszeit war das Trinkwasser frei zugänglich. Eine Kontrollgruppe erhielt analog eine substanzfreie Milchzubereitung.

c) Intraperitoneale Applikation

Die ÄDAx2HCl 5a, 7b, 14b, 23b und 25a wurden in ihre öligen Basen überführt und zu ca. 10% in Olivenöl(Livio®) gelöst. Jeweils 10 Tieren wurden während 3 Wochen fünfmal wöchentlich je nach Körpergewicht mit ca. 0,25ml öliger Lösung i.p. gespritzt. Bei Verb. 7b wurde der Versuch nach 3 Wochen beendet, die übrigen Behandlungsgruppen standen

zusammen mit der Kontrollgruppe noch weitere 3 Wochen unter Beobachtung.Während des ganzen Versuches hatten die Tiere freien Zugang zu Wasser und Altromin R.

d) Orale Applikation mit der Schlundsonde

Die ölige Base von 7b wurde zu 10,6% in Erdnußöl gelöst; davon wurde 15 Tieren während 3 Wochen fünfmal pro Woche 0,5ml/kg Ratte mit der Schlundsonde oral verabreicht, bei 3 Wochen Versuchsdauer und freiem Zugang zu Wasser und Futter.

III Prüfung von Diäthylstilböstrol auf tumorhemmende Wirkung

Die Mammatumor-Induktion erfolgte nach Abschnitt D.II.2) mit 3 x 2mg DMBA, gelöst in 0,05ml DMSO.

Die behandlungsfähigen Tumortiere wurden in Zehnergruppen eingeteilt. Die Behandlung mit Diäthylstilböstrol(DES) erfolgte in 3 Dosierungen: es wurden jeweils dreimal wöchentlich 6,0 , 1,9 und 0,6mg/ kg Ratte DES s.c. verabreicht.Dazu wurde das DES in einer wässerigen, 0,9% Natriumchlorid und 0,6% Methylzellulose(MH 2000) enthaltenden Lösung sehr fein verrieben und zu einer Suspension verarbeitet.

Alle Tiere wurden 3 Wochen behandelt und anschließend 3 Wochen beobachtet. Bei der stärksten Dosierung wurden 2 Zehnergruppen behandelt. Die Tiere wurden zu fünft in Edelstahlkäfigen gehalten und erhielten Altromin R als Futter und Trinkwasser ad libitum, der Verbrauch von beidem wurde registriert. Die entsprechende Kontrollgruppe wurde genauso behandelt. Die Tumormessung erfolgte wie bei Abschnitt D.II.2) c) durch Bestimmung der angenäherten Fläche.

IV Tumorhemmung durch Ovarektomie

10 Tumortiere wurden 120 Tage nach der DMBA-Behandlung nach folgendem Verfahren ovarektomiert(128):

Wir betäubten die Tiere in einem Exsiccator mit Diäthyläther und steuerten die Anästhesie während des Eingriffes durch die Vorlage eines mit Äther getränkten Wattebausches, der sich in einem kleinen Becherglas befand und den Tieren das Einatmen eines Äther-Luft-Gemisches ermöglichte. Nach Befeuchten des entsprechenden Hautbereiches mit verdünntem Äthanol durchtrennten wir die Rückenhaut genau über der Wirbelsäule im Bereich des Beckens mit einem kleinen Schnitt. Unter Verschiebung dieses Einschnittes öffneten wir die Bauchhöhle beidseitig der Wirbelsäule durch zwei kleine, vertikale Schnitte. Die in Fettgewebe eingehüllten Ovarien waren jetzt leicht zugänglich und wurden, noch mit dem Eileiter verbunden, vorsichtig herausgezogen. Durch kleine Schnitte, direkt am Ovar, trennten wir die Eileiter ab und legten sie in die Körperhöhle zurück, während die Ovarien mitsamt dem Fettgewebe entfernt wurden. Wir bedeckten den Hauteinschnit mit Sulfonamidpuder und verschlossen ihn mit zwei kleinen Wundklammern.

Ein Tier starb während des Eingriffes durch zu starke Anästhesie. Die übrigen Tiere wurden während der Anästhesie gut warmgehalten und erholten sich schnell von dem Eingriff.

Die Tiere standen anschließend 5 Wochen lang unter den üblichen Bedingungen unter Beobachtung.

V. Tumorhemmung durch Futtereinschränkung

1) Bei jungen hormonabhängigen Tumoren

Je 10 Tiere im Alter von 17 Wochen, deren Tumoren nach Abschnitt D.I II.2)a) mit 3 x 2mg DMBA in 0,05ml DMSO induziert worden waren und alle nach 9-11 Wochen auftraten, bildeten eine Versuchs- und eine Kontrollgruppe. Neben der üblichen Tumorflächenmessung wurden die Tiere dreimal wöchentlich gewogen. Die Versuchstiere erhielten gerade soviel Futter (Altromin R), daß ein gleichmäßiger, am Versuchsende nach 3 Wochen,ungefähr 25% des Ausgangsgewichts betragender Körpergewichtsverlust erzielt wurde. Die Kontrolltiere erhielten das Futter uneingeschränkt, beide Gruppen Trinkwasser ad libitum.

2) Bei alten hormonunabhängigen Tumoren

a) Prüfung der Hormonabhängigkeit

15 Tiere wurden wie unter 1) mit DMBA behandelt. Alle Tumoren traten 15-17 Wochen nach der Induktion auf.Nachdem wir das Flächenwachstum 3 Wochen lang registriert hatten, wurden die Tiere ovarektomiert und weitere 7 Wochen beobachtet.Jetzt wurden 10 Tiere ausgewählt, deren Tumoren, nach zwischenzeitlicher, starker Rückbildung aufgrund der Ovarektomie, erneut Flächenwachstum zeigten und deswegen als hormonunabhängig klassifiziert werden konnten.

b) Futtereinschränkung

Diese Tiere wurden zufällig in zwei Fünfergruppen eingeteilt, in eine Versuchs- und eine Kontrollgruppe.

Die Versuchstiere erhielten 4 Wochen lang die gleiche,verminderte Futtermenge wie die Tiere bei Versuch 1); die Kontrolltiere hatten freien Zugang zum Futter. Beide Gruppen erhielten Trinkwasser ad libitum.

E. STATISTISCHER TEIL

I H-Test nach KRUSKAL und WALLIS(82)

1) Der Vergleich der Tumorzahlen aus den Vorversuchen am Versuchsanfang(Abschnitt C.III.2)b))

Die einzelnen Stichproben bestehen aus den Behandlungsgruppen einer Versuchsserie, in denen die Tumorzahlen(=Summen der Tumoren) am Versuchsanfang erfaßt werden. Die Tumorzahlen jeder Behandlungsgruppe haben heterogene Varianzen und sind voneinander unabhängig.Es werden die Verteilungen der Tumorzahlen von 7 Versuchsserien miteinander ve verglichen. Dazu wird aus den Tumorzahlen ein Kollektiv mit dem Umfang n gebildet; dann werden die Tumorzahlen der Größe nach sortiert, ihnen Ränge von 1-n zugeteilt, diese Ränge nach Stichproben sortiert, und die Summen der Rangzahlen(= Rangsummen) jeder Stichprobe miteinander verglichen; gleiche Tumorzahlen erhalten mittlere Rangzahlen. In Tabelle 14 sind die den einzelnen Stichproben mit den Umfängen n_i zukommenden Rangsummen und die entsprechenden Erwartungswerte aufgeführt.

Die Prüfgröße $\hat{H}$ verteilt sich unter der Nullhypothese nach x^2 mit k-1 = 6 Freiheitsgraden(FG) und wird berechnet nach:

$$\hat{H} = \left[\frac{12}{n(n-1)}\right]\left[\sum_{i=1}^{k} \frac{R_i^2}{n_i}\right] - 3(n-1)$$

$$\hat{H} = 19{,}56$$

Vergleich mit dem Tabellenwert: $x^2 = 12{,}59_{(6\ FG;\alpha=0{,}05)}$

$$\hat{H} > \chi^2$$

Damit wird die Nullhypothese verworfen zugunsten der Alternativhypothese.

Tabelle 14: Vergleich der Rangsummen der Stichproben am Anfang der Versuchsserien

Stichprobe	Umfang n_i	Tumorzahl	Rangsumme R_i	erwartete Rangsumme
	5	25	32,5	152,5
2	10	62	207,5	305
3	4	29	128,5	122
4	99	61	244	274
5	11	85	403	335,5
6	9	71	320	274
7	12	100	494,5	366
Summe	60		1830	1830

2) Vergleich der während der Versuche neu auftretenden Tumoren

Die einzelnen Stichproben bestehen aus den Behandlungsgruppen einer Versuchsserie, in denen die Zahlen der während des Versuchs neu auftretenden Tumoren erfaßt werden. Es werden wie unter 1) die Rangsummen verglichen.

In Tabelle 15 sind die den einzelnen Stichproben mit den Umfängen n_i zukommenden Rangsummen und die Erwartungswerte aufgeführt.

Tabelle 15: Vergleich der Rangsummen der Stichproben der während der Versuche neu auftretenden Tumoren in den Versuchsserien 1-7

Stichprobe	Umfang n_i	Tumorzahl	Rangsumme R_i	erwartete Rangsumme
1	5	4	76,5	152,5
2	10	16	242	305
3	4	2	47	122
4	9	21	275	274
5	11	29	344,5	335,5
6	9	24	314,5	274
7	12	65	530,5	366
Summe	60		1830	1830

$$\hat{H} = 17{,}7 > 12{,}59 = \chi^2_{(6\ FG;\ \alpha=0{,}05)}$$

Damit wird die Nullhypothese verworfen zugunsten der Alternativhypothese.

II. Berechnung des Korrelationskoeffizienten für den Zusammenhang zwischen Tiergewichtsreduktion und Tumorwachstum(Abschn.C.IV.1)

Die prozentuale Tiergewichtsreduktion und die prozentuale Tumorflächenänderung stellen zwei nicht normalverteilte Reihen dar. Zur Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach SPEARMAN(82): $(-1 = \hat{r}_S = +1)$ werden die beiden Reihen durch die Zuordnung von Rangzahlen in Rangreihen transformiert. Nach Bildung der Differenzen D

der n Rangpaare wird summiert und damit r_S berechnet. In Tabelle 16 sind die Werte x = %Tiergewichtsreduktion und y = %Tumorflächenänderung und die zugehörigen Rangzahlen R_x und R_y angegeben.

Tabelle 16: Zusammenhang zwischen Tiergewichtsreduktion unf Tumorflächenänderung; Zuteilung von Rangzahlen zur Berechnung von $\hat{r}_S$

Verb.Nr.	Tiergewichts-änderung in % x	Rangzahl R_x	Tumorflächen-änderung in % y	Rangzahl R_y
Kontr.1	8,9	1	209	11
4a	-3,3	2	67	10
28a	-6,2	3	49	8
28b	-7,4	4	16	6
19b	-11,9	5	45	7
7a	-13,1	6	50	9
11b	-14,1	7	-3	5
11a	-14,6	8	-42	1
Kontr.2	-17,7	9	-29	4
19a	-21,0	10	-35	3
7b	-21,3	11	-38	2

Die Berechnung von r_S erfolgt nach: $\hat{r}_S = 1 - \frac{6 \sum D^2}{n(n^2-1)}$

mit $D = R_x - R_y$ und n = 11;

$$\hat{r}_S = -0{,}8818 > 0{,}8167 = r_S \ (n=11; \alpha=0{,}05)$$

Es besteht negative Korrelation zwischen den beiden Rangreihen und damit ein echter Zusammenhang zwischen Tiergewichtsreduktion und Tumorwachstum: je stärker das Tiergewicht während des Versuches zurückgeht, umso geringer ist das Tumorwachstum.

III. Auswertung von Häufigkeiten mit kx2-Felder-Tafeln

1) Der Vergleich der Tumorhäufigkeiten bei den Versuchen mit Milchemulsion (Abschnitt c.IV.2)b))

Tabelle 17: 11x2-Felder-Tafel der Milchversuche; die Zahl der Tumoren mit gehemmtem Wachstum und ohne Wachstumshemmung werden als Alternativdaten aufgefaßt

Verb.Nr	Merkmal TH(+) x_i	Merkmal KH(-) n_i-x_i	Summe TZ n_i
Kontr.	3	17	20
19a	4	11	15
7a	10	20	30
11b	5	15	20
7b	3	23	26
19b	4	19	23
12b	4	8	12
29b	7	11	18
28a	4	23	27
12a	6	16	22
11b	19	13	32
Summe	69	176	245

Der Anteil der Tumoren mit gehemmtem Wachstum(TH) und der Anteil ohne Wachstumshemmung(KH) an der Gesamttumorzahl(TZ) jeder Behandlungsgruppe der Versuche mit Milchemulsion stellen jeweils eine Stichprobe von Alternativdaten dar. Daraus läßt sich obenstehende 11x2-Felder-Tafel (Tabelle 17) erstellen. Zur Entscheidung über Beibehaltung oder Ablehnung der Nullhypothese auf Homogenität der 11 binomialen Stichproben wird χ^2 berechnet nach der Formel von BRANDT-SNEDECOR:

$$\hat{\chi}^2 = \frac{n^2}{x(n-x)}\left[\sum_{i=1}^{k}\frac{x_i^2}{n_i} - \frac{x^2}{n}\right] \qquad \text{mit } n = \sum n_i, \quad x = \sum x_i$$

$$\hat{\chi}^2 = 25{,}36 > 18{,}31 = \chi^2_{(10\ FG;\alpha=0{,}05)}$$

Es gilt die Alternativhypothese: die Alternativdaten sind nicht homogen, es bestehen Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.

2) Der Vergleich der Tumorhäufigkeiten bei den Versuchen mit Milchemulsion(ohne Behandlungsgruppe 11a)

Es gelten die gleichen Bedingungen wie unter 1); es läßt sich eine 10x2-Felder-Tafel aufstellen. Aus den 10 binomialen Stichproben wird χ^2 berechnet:

$$\hat{\chi}^2 = 8{,}605 < 16{,}92 = \chi^2_{(9\ Fg;\alpha=0{,}05)}$$

Es gilt die Nullhypothese auf Homogenität der 10 Stichproben.

3) Der Vergleich der Tumorhäufigkeiten bei verschiedenen Applikationsarten nach drei Wochen(Abschnitt C.IV.3)b)), unter Zerlegung der Freiheitsgrade

Für die Bezeichnung der Tumorhäufigkeiten gelten die gleichen Bedingungen wie unter 1).Für die 13 Behandlungsgruppen wird die 13x2-Felder-Tafel so formuliert, daß die Erfolgsprozentsätze der Häufigkeiten TH(Plusmerkmalsträger) an dem jeweiligen Stichprobenumfang(TZ) für alle Stichproben miteinander verglichen werden können (Tabelle 18).

Tabelle 18: 13x2-Felder-Tafel der Tumorhäufigkeiten bei Behandlung mit verschiedenen Applikationsarten nach 3 Wochen

Behandlungsnummer*)	Merkmal $x_i(+)$	$n_i-x_i(-)$	Summe n_i	Erfolgsprozent $p_i=x_i/n_i$
1	7	6	13	0,538
2	9	9	18	0,500
3	14	15	29	0,483
4	10	11	21	0,476
5	13	18	31	0,419
6	8	17	25	0,320
7	5	12	17	0,294
8	6	16	22	0,273
9	8	25	33	0,242
10	6	19	25	0,240
11	6	20	26	0,231
12	5	18	23	0,217
13	3	25	28	0,107
Summe	100	211	311	$\hat{p}$ =0,3215

*) Nummerierung wie bei Tabelle 7a, Seite 57

Die χ^2-Gesamtabweichung vom Erfolgsprozentsatz $\hat{p}$ wird berechnet nach:

$$\hat{\chi}^2_{gesamt} = \frac{\sum_{i=1}^{k} x_i p_i - x\hat{p}}{\hat{p}(1-\hat{p})}$$

$$\hat{\chi}^2_{gesamt} = 23{,}1988 > 21{,}03 = \chi^2_{(12\ FG;\alpha=0{,}05)}$$

Es bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Erfolgsprozentsätzen p_i.

Nach Aufteilung der Stichproben in zwei, in Bezug auf p_i möglichst homogene Gruppen I und II lassen sich nach der gleichen Formel die χ^2-Anteile der einzelnen Gruppen am Gesamt-χ^2 berechnen, unter gleichzeitiger Zerlegung der Freiheitsgrade. Die Gruppeneinteilung ist in Tabelle 18a dargestellt.

Tabelle 18a: Aufteilung der Stichproben aus Tabelle 18 in 2 Gruppen

Beh.Nr.	Gruppe	x_i	n_i-x_i	n_i	p_i
1 - 5	I	53	59	112	0,473
6 -13	II	47	152	199	0,309
Summe		100	211	311	

Es ergeben sich folgende χ^2-Werte für Unterschiede

1. zwischen den beiden Gruppen I und II:

$$\hat{\chi}^2_{I,II} = 18{,}4573 > 3{,}84 = \chi^2_{(1\ FG;\alpha=0{,}05)} \quad ;$$

es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf die Erfolgsprozentsätze;

2. innerhalb Gruppe I (Beh.1-5):

$$\hat{\chi}^2_{I} = 0{,}6459 < 9{,}49 = \chi^2_{(4\ FG;\alpha=0{,}05)} \quad ;$$

die Erfolgsprozentsätze innerhalb von I sind homogen;

3. innerhalb von Gruppe II (Beh.6-13):

$$\hat{x}^2_{II} = 4{,}096 < 14{,}07 = x^2_{(7\ FG;\alpha=0{,}05)} \quad ;$$

die Erfolgsprozentsätze innerhalb von II sind homogen.

4) Der Vergleich der Tumorhäufigkeiten bei verschiedenen Applikationsarten nach sechs Wochen unter Zerlegung der Freiheitsgrade

Es wird wie unter 3) verfahren; die Erfolgsprozenzsätze sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: 11x2-Felder-Tafel der Tumorhäufigkeiten bei Behandlung mit verschiedenen Applikationsarten nach 6 Wochen

Behandlungs-nummer*)	Merkmal $x_i(+)$	$n_i-x_i(-)$	Summe n_i	Erfolgsprozent $p_i=x_i/n_i$
1	8	5	13	0,615
2	19	17	36	0,528
3	10	22	32	0,313
4	6	15	21	0,286
5	9	22	31	0,290
6	12	30	42	0,286
7	7	18	25	0,280
8	8	26	34	0,235
9	8	29	37	0,216
10	5	22	27	0,185
11	5	27	32	0,156
Summe	97	233	330	$\hat{p}$ =0,294

*) Nummerierung wie bei Tabelle 7b, Seite 58

$$\hat{\chi}^2_{gesamt} = 22{,}1585 > 18{,}31 = \chi^2_{(10\ FG;\alpha=0{,}05)}$$

Tabelle 19a: Aufteilung der Stichproben aus Tabelle 19 in 2 Gruppen

Beh.Nr.	Gruppe	x_i	n_i-x_i	n_i	p_i
1 + 2	I	27	22	49	0,551
3 -11	II	70	211	281	0,249

Es ergeben sich folgende χ^2-Abweichungen:

1.zwischen den beiden Gruppen I und II

$$\hat{\chi}^2_{I,II} = 18{,}325 > 3{,}84 = \chi^2_{(1\ FG;\alpha=0{,}05)} \quad ;$$

es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf die Erfolgsprozentsätze;

2. innerhalb Gruppe I (Beh.1 + 2)

$$\hat{\chi}^2_{I} = 0{,}2963 < 3{,}84 = \chi^2_{(1\ FG;\alpha=0{,}05)} \quad ;$$

die Erfolgsprozentsätze innerhalb von I sind homogen;

3. innerhalb Gruppe II (Beh.3 -11)

$$\hat{\chi}^2_{II} = 3{,}861 < 15{,}51 = \chi^2_{(8\ FG;\alpha=0{,}05)}$$

die Erfolgsprozentsätze innerhalb von II sind homogen.

IV. Varianzanalyse: Auswertung der prozentualen Tumorflächenänderungen (Varianzanalyse zeitlicher Verlaufsreihen)

a) Voraussetzungen

Die nach $x' = \log x + 100$ transformierten Werte der prozentualen Tumorflächenänderungen gegenüber der Anfangsfläche aller Tiere, zu allen Zeitpunkten einer Behandlung, werden unter der Annahme angenäherter Normalverteilung mit dem Test nach HARTLEY(82) überprüft, und ergeben innerhalb jeder Behandlung Varianzengleichheit.

b) Modellbeschreibung

Es handelt sich um ein partiell hierarchisches Modell mit den Werten $x_{ij1} \cdots \overset{x_{ijk}}{\cdots} \cdots x_{ij10}$, die zu 10 aufeinander folgenden Zeitpunkten(k) an einem Tier(j) gemessen werden. Jede Behandlung(i=11) umfaßt 10 Tiere.

Die Modellgleichung lautet:

$$x_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_{j(i)} + \gamma_k + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{j(i)k} + \varepsilon_{ijk}$$

Der Beobachtungswert x_{ijk} setzt sich zusammen aus Gesamtmittel μ, Behandlungseffekt α_i, Tiereffekt innerhalb einer Behandlung $\beta_{j(i)}$, Zeiteffekt γ_k, Wechselwirkung Behandlung/Zeit $(\alpha\gamma)_{ik}$ und dem Versuchsfehler $((\beta\gamma)_{j(i)k} + \varepsilon_{ijk}) = v_{ijk}$.

Davon sind $\alpha_i, \gamma_k, (\alpha\gamma)_{ik}$ feste Effekte, unter den Bedingungen:

$$\sum_{i=1}^{I} \alpha_i = \sum_{k=1}^{K} \gamma_k = \sum_k (\alpha\gamma)_{ik} = \sum_i (\alpha\gamma)_{ik} = 0 \ ,$$

und $\beta_{j(i)}$ und v_{ijk} zufällige Effekte, unter den Bedingungen: $\beta_{j(i)}$ sind normalverteilt mit Mittelwert 0 und Varianz σ_b^2,

$$\beta_{j(i)} \sim N\ (0,\sigma_b^2) \quad \text{und} \quad v_{ijk} \sim N\ (0,\sigma_b^2)\ .$$

Es sind folgende Nullhypothesen zu prüfen:

$H_{0\alpha}$: $\alpha_i = 0$ Es bestehen keine Unterschiede zwischen den Behandlungen

H_{0w} : $(\alpha\gamma)_{ik} = 0$ Es bestehen keine Unterschiede im zeitlichen Verlauf(Prüfung auf Wechselwirkung)

$H_{0\gamma}$: $\gamma_k = 0$ Es bestehen keine Unterschiede zwischen den Zeiten

c) Auswertung

Es werden I + 1 Zweiweg-Varianzanalysen durchgeführt. In der ersten Analyse werden die Haupteffekte von Behandlung und Zeit, sowie die Wechselwirkung Behandlung/Zeit ermittelt. Die Summe der Abweichungsquadrate(SAQ)$_{\text{innerhalb der Behandl.}}$("Rest" oder "Wiederholungen") wird dann weiter unterteilt. Dies geschieht durch I Varianzanalysen - jeweils eine für eine Behandlung. In jeder Analyse erhält man unter anderem einen Beitrag zur Varianz s_b^2 (bezeichnet als β_{ij} in Tabelle 20), dem Schätzwert für σ_b^2 (mittleres Abweichungsquadrat MAQ$_{\text{zwischen den Tieren innerhalb der Behandlung}}$) mit I(n-1) FG.

d) Streuungszerlegung(in Tabelle 20)

Tabelle 20: Streuungszerlegung

Art d.Streuung	Symbol	FG	MAQ	$\hat{F}$ $F_{0,05}$
Zw.d.Behandl.	α_i	10	4,75379	$\frac{\alpha_i}{\beta_{ij.}} = 2,90 > 1,95_{(10,\ 99)}$
Zw.d.Zeiten	γ_k	9	1,45149	$\frac{\gamma_k}{(\beta\gamma)_{ijk}} = 3,10 > 1,89_{(\ 9,891)}$
Zw.d.Tieren von Beh.1	$\beta_{1j.}$	9	0,25543	
" " Beh.2	$\beta_{2j.}$	9	0,71966	
" " Beh.3	$\beta_{3j.}$	9	0,42455	
" " Beh.4	$\beta_{4j.}$	9	0,54358	
" " Beh.5	$\beta_{5j.}$	9	1,78367	
" " Beh.6	$\beta_{6j.}$	9	0,35240	
" " Beh.7	$\beta_{7j.}$	9	2,43874	
" " Beh.8	$\beta_{8j.}$	9	0,85989	
" " Beh.9	$\beta_{9j.}$	9	0,65428	
" " Beh.10	$\beta_{10j.}$	9	0,74115	
" " Beh.11	$\beta_{11j.}$	9	9,22991	
Zw.d.Tieren insgesamt	$\beta_{ij.}$	99	1,63666	
Wechselwirkung Behandlung/Zeit	$(\alpha\gamma)_{ik}$	90	0,10669	$\frac{(\alpha\gamma)_{ik}}{(\beta\gamma)_{ijk}} = 0,23 <\sim 1$ (90,891)
Wechselwirkung Tiere$_{B\ 1}$/Zeit	$(\beta\gamma)_{1jk}$	81	0,01489	
Tiere$_{B\ 2}$/Zeit	$(\beta\gamma)_{2jk}$	81	0,01798	
Tiere$_{B\ 3}$/Zeit	$(\beta\gamma)_{3jk}$	81	0,02173	
Tiere$_{B\ 4}$/Zeit	$(\beta\gamma)_{4jk}$	81	0,00927	
Tiere$_{B\ 5}$/Zeit	$(\beta\gamma)_{5jk}$	81	0,06149	
Tiere$_{B\ 6}$/Zeit	$(\beta\gamma)_{6jk}$	81	0,03336	
Tiere$_{B\ 7}$/Zeit	$(\beta\gamma)_{7jk}$	81	0,05234	
Tiere$_{B\ 8}$/Zeit	$(\beta\gamma)_{8jk}$	81	0,03350	
Tiere$_{B\ 9}$/Zeit	$(\beta\gamma)_{9jk}$	81	0,02093	
Tiere$_{B10}$/Zeit	$(\beta\gamma)_{10jk}$	81	0,08028	
Tiere$_{B11}$/Zeit	$(\beta\gamma)_{11jk}$	81	1,12191	
WW Tiere/Zeit insgesamt	$(\beta\gamma)_{ijk}$	891	0,46768	

e) Ergebnis

$H_{0\alpha}$: $\alpha \neq 0$ Die Behandlungskurven sind parallel verschoben

H_{0w} : $(\alpha\gamma)_{ik} = 0$ Es konnten keine Unterschiede in den zeitlichen Verläufen festgestellt werden.

$H_{0\gamma}$: $\gamma \neq 0$ Es bestehen Unterschiede zwischen den Zeiten

f) Lineare Kontraste nach SCHEFFÉ(89)

Da die Nullhypothese $H_{0\alpha}$ verworfen wird, kann ein Vielfachvergleich der Behandlungsmittelwerte anhand von linearen Kontrasten durchgeführt werden. Der entsprechende F-Wert hat I-1,I(n-1) FG. Es wird ein linearer Kontrast $L = \sum_{i=1}^{I} \lambda_i \alpha_i$ definiert, wobei die λ_i Konstanten sind, mit der Nebenbedingung : $\sum_{i=1}^{I} \lambda_i = 0$.

Die Behandlungsmittelwerte sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 21: Behandlungsmittelwerte

Behandlungs-nummer	Verbindung Nummer	Mittelwert $\bar{x}_i$
1	Placebo	2,4324
2	23a	2,3408
3	23b I	2,2789
4	23b II	2,4057
5	23b i.p.	2,3249
6	14b	2,1950
7	25a	2,1438
8	5a	2,3036
9	Kontrolle	2,3417
10	DES I	2,1508
11	DES II	1,6408

Es soll der $\bar{x}_{Beh.11}$ mit allen übrigen Behandlungsmittelwerten $\bar{x}_i$ verglichen werden.

L wird geschätzt durch $\hat{L} = \sum_{i=1}^{I} \lambda_i \bar{x}_{i..}$

$$= \frac{1}{10}(\bar{x}_{Beh.1} + \bar{x}_{Beh.2} \cdots\cdots + \bar{x}_{Beh.10}) - 1{,}6408$$

$$\hat{L} = 0{,}6510$$

Die Varianz von $\hat{L}$ ist:

$$Var\{\hat{L}\} = Var\left\{\sum_{i=1}^{I} \lambda_i \bar{x}_{i..}\right\} = \sum_{i=1}^{I} \lambda_i^2 \frac{\sigma_b^2}{N}$$, wenn die $\bar{x}_{i..}$ unabhängig voneinander sind.

Die Varianz wird geschätzt nach:

$$Var\{\hat{L}\} = \hat{s}_L^2 = \frac{s_b^2}{N} \sum_{i=1}^{I} \lambda_i^2 \quad \text{mit } N = k \times n = 110$$

$$\hat{s}_L^2 = \sqrt{\frac{1{,}6367}{110}\left(\frac{1}{10} + 1\right)} = 0{,}1279$$

Das Ergebnis für den SCHEFFÉ-Test lautet:

Für alle möglichen Kontraste L gilt

$$W\left\{\hat{L} - s\sqrt{\hat{Var}\{\hat{L}\}} < L < \hat{L} + s\sqrt{\hat{Var}\{\hat{L}\}}\right\} = 1 - \alpha \quad , \qquad ①$$

mit $s^2 = (I-1)\, F_{1-\alpha(I-1, I(n-1))}$

Für die Prüfung der Nullhypothese L = 0 wird die Testgröße $\frac{\hat{L}^2}{\hat{Var}\{\hat{L}\}}$ benutzt, die F-verteilt ist mit (I-1), I(n-1) FG.

Vergleich von Behandlung 11 mit allen anderen Behandlungen:

$$\frac{\hat{L}}{\hat{Var}\{\hat{L}\}} = \frac{0{,}6510}{0{,}1279} = 5{,}09 > 3{,}87 = \sqrt{9 \times 1{,}67_{(\alpha=0{,}10;\ 10;\ 99)}}$$

Der Mittelwert von Beh.11 ist signifikant von anderen Behandlungsmittelwerten verschieden.

Es wird auf Empfehlung von SCHEFFÉ(89) ein α von 0,10 verwendet, da eine Aussage wie ①, die für alle möglichen Kontraste Gültigkeit hat, sehr konservativ ist.

V. WILCOXON-Rangtest zweier unverbundener Stichproben

1) Vergleich des Futterverbrauchs der Behandlungsgruppe 23a (Schlundsonde) und der Kontrollgruppe

Die Stichproben bestehen aus der Behandlungs- und Kontrollgruppe, bei denen der Futterverbrauch in g/kg Ratte und Versuchstag bestimmt worden ist. Allen Werten der beiden Stichproben werden gemeinsam entsprechende Rangzahlen zugeordnet. Für jede Stichprobe werden die Rangsummen T_1 und T_2 ermittelt (in Tabelle 22).

Tabelle 22: Rangzuordmung für den Vergleich des Futterverbrauchs in g/kg von Behandlung 23a und der Kontrolle

Meßtag	Futterverbr. Behandl. $=N_1$	Rang	Futterverbr. Kontr. $=N_2$	Rang
1	58	2,5	57	1
2	58	2,5	75	11
3	71	8,5	82	14,5
4	64	4	71	8,5
5	66	6,5	72	10
6	78	12	82	14,5
7	66	6,5	89	18
8	65	5	86	16
9	79	13	84	17
		$T_1 = 60,5$		$T_2 = 110,5$

Da nach den Wiss. Tabellen(129) für $\alpha = 0{,}05$(zweiseitig) und N_1, $N_2=9$ $T_1 = 62 > 60{,}5 = T_1$, gilt $m_1 \neq m_2$; Die Medianwerte der Behandlungs- und Kontrollgruppe sind signifikant verschieden.

2) Vergleich des Futterverbrauchs der Behandlungsgruppe 25a und der Kontrollgruppe

Es wird wie unter 1) verfahren.

Tabelle 23: Rangzuordnung für den Vergleich des Futterverbrauchs in g/kg von Behandlung 25a und der Kontrolle

Meßtag	Futterverbr. Behandl.=N_1	Rang	Futterverbr. Kontr.=N_2	Rang
1	44	1	71	6,5
2	54	2	71	6,5
3	57	3	76	10,5
4	66	4	77	12
5	70	5	80	13
6	72	8	85	14
7	74	8	88	15
8	76	10,5	90	16
9	91	17,5	91	17,5
	T_1 =	60	T_2 =	111

Für N_1, $N_2 = 9$, $\alpha = 0{,}05$(zweiseitig) ist $T_1 = 62 > 60 = T_1$

$m_1 \neq m_2$

Die Rechenarbeit erfolgte zum Teil mit den Statistikprogramm-Paketen STATSYS und ISTAP auf der Siemens 4004/151 des Institutes für Medizinische Datenverarbeitung der GSF.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Aus ringunsubstituierten N-Alkyl-benzyliden-aminen(1 - 16) und ringsubstituierten(R'= CH_3, F, Cl, Br, J) N-Butyl-benzyliden-aminen (17 - 29)wurden durch Reduktion mit aktiviertem Aluminium in Äthanol /Toluol oder mit Benzpinacol in Isopropanol diastereomere N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamine(ÄDA) hergestellt, die Bildungsverhältnisse racem- zu meso-ÄDA mit analytischer Craigverteilung untersucht, die Diastereomeren durch Kristallisationsverfahren oder präparative Verteilung getrennt und durch NMR-Spektroskopie konfigurativ zugeordnet.

Bei der Prüfung der ÄDA am 7,12-Dimethyl-benz(a)anthracen-induzierten, hormonabhängigen Mammatumor der Sprague-Dawley-Ratte nach einem einheitlichen Versuchsschema(Dosis 3 x 10^{-3}Mol/kg Ratte s.c., 5 Tiere, 3 Wochen Versuchsdauer) konnten aufgrund der Uneinheitlichkeit des Tumormodells, der unsicheren Applikationsart, der durch geringe Tumortierausbeuten bedingten, begrenzten Tierzahl und der damit verbundenen statistischen Unsicherheit, keine eindeutige Substanzauswahl für ausführliche Hemmversuche an diesem Tumormodell getroffen werden.

Die Prüfung ausgewählter ÄDA mit verschiedenen Applikationsarten, wie oraler Gabe durch Futterpellets(mit und ohne Mikroverkapselung), in Form einer Milchemulsion oder mit der Schlundsonde, und mit intraperitonealer Injektion zeigte, daß die beiden Verbindungen racem-N,N'-Di-3-methyl-butyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin(11a) und meso-N,N'-Di-1,2,2-trimethyl-propyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin(14b)

schwach tumorhemmend wirken. Der Hemmeffekt ließ sich statistisch absichern, und zwar in Bezug auf den Prozentanteil der Tumoren mit gehemmtem Wachstum an der Gesamtheit der Tumoren einer Behandlungsgruppe.

Die Hemmeffekte, die nach Verfütterung von ÄDA in Form von Futterpellets beobachtet wurden, ließen sich zum größten Teil auf die gleichzeitig eingetretenen Körpergewichtsreduktionen zurückführen. Dabei zeigten racem-N,N'-Dibutyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin(5a) und racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4-chlor-phenyl)-äthylendiamin(25a) einen deutlichen appetitzügelnden Effekt.

Die vergleichende Tumorhemmung durch Diäthylstilböstrol-Behandlung, Ovarektomie und Futtereinschränkung zeigte die eindeutige Überlegenheit der Organablation und leichte Beeinflussbarkeit des Tumorwachstums durch Körpergewichtsreduktion. Mit Diäthylstilböstrol waren sichere Hemmeffekte(signifikante Verminderungen der durchschnittlichen Tumorfläche) nur mit Dosen erreichbar, die schon das Körpergewicht reduzierten.

Für die statistische Absicherung von Tumorflächenänderungen erwies sich die Varianzanalyse von Zeit-Wirkungsverläufen als geeignetes Verfahren.

Entscheidungen in der wirkmechanistischen Diskussion (Östrogenantagonismus der ÄDA, direkte östrogene Wirkung oder Beeinflussung der Prolaktinfreisetzung) bedürfen weiterer Untersuchungen.

G. LITERATURVERZEICHNIS

1) T.L.DAO, The Role of Hormone Therapy in the Management of Metastatic Breast Cancer, M.L.GRIEM et al.(eds.), Breast Cancer: A Challenging Problem, Springer Verlag Berlin,Heidelberg,New York, S.131 (1973)

2) P.J.FOLCA, Lancet II, 796 (1961)

3) J.MEITES in T.L.DAO(ed.), Estrogen Target Tissues and Neoplasia Univ.of Chicago Press Chicago, London, S.285 (1972)

4) J.A.LEATHEN, Proc.Penn.Acad.Sci. 35, 99 (1961)

5) L.J.DIETRICH, Cancer Res. 21, 502 (1961)

6) D.ADAM, H.SCHÖNENBERGER, Arzneimittel-Forsch. 16, 738 (1966)

7) W.T.BRADNER et al., Cancer Res. 18, 299 (1958)

8) G.MARTZ, Die hormonelle Therapie maligner Tumoren, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1968)

9) H.BERNAUER, Dissertation Universität München (1965)

10) H.SCHÖNENBERGER et al., Arzneimittel-Forsch. 21, 2104 (1971)

11) H.THIES, H.SCHÖNENBERGER, Chem.Ber. 89, 1918 (1956)

12) H.THIES, H.SCHÖNENBERGER, Arch.Pharmaz. 289, 408 (1956)

13) H.THIES, H.SCHÖNENBERGER, K.H.BAUER, Arch.Pharmaz. 291, 373 (1958)

14) H.THIES, H.SCHÖNENBERGER, K.H.BAUER, Arch.Pharmaz. 291, 620 (1958)

15) W.STÜHMER, G.MESSWARB, Arch.Pharmaz. 286, 221 (1953)

16) O.ANSELMINO, Ber.dtsch.chem.Ges. 41, 623 (1908)

17) A.PADWA, W.BERGMARK, D.PASHAYAN, J.Amer.chem.Soc. 91, 2260 (1969)

18) H.SCHÖNENBERGER et al., Arch.Pharmaz. 298, 367 (1965)

19) H.SCHÖNENBERGER et al., Arch.Pharmaz. 300, 258 (1967)

20) H.SCHÖNENBERGER et al., Arch.Pharmaz. 300, 268 (1967)

21) H.SCHÖNENBERGER et al., Arch.Pharmaz. 300, 483 (1967)

22) M.EDER, Dissertation Universität München (1962)

23) H.SCHÖNENBERGER, Chem.Ber. 91, 862 (1958)

24) D.STRANSKY, Dissertation Universität München, in Vorbereitung

25) T.HIGUCHI, K.KATO, J.pharmac.Sci.,55, 1080 (1966)

26) T.HIGUCHI et al., Anal.Chem. 39, II, 974 (1967)

27) A.RAPPL, Dissertation Universität München (1964)

28) R.SCHÖNENBERGER, C.SUNKEL, H.SCHÖNENBERGER, Arzneimittel-Forsch. 22, 1952 (1972)

29) E.HECKER, Chemie-Ing.Techn. 25, 505 (1953)

30) R.STERN, J.ENGLISCH, H.CASSIDY, J.Amer.chem.Soc. 79, 5798 (1957)

31) C.B.HUGGINS, Cancer Res. 25, 1163 (1965)

32) J.W.ORR, Brit.Exp.Cancer Campaign, 33rd Annual Report, 235 (1955)

33) W.F.DUNNING et al., Amer.J.Cancer 40, 85 (1940)

34) R.P.GEYER et al., Cancer Res. 13, 503 (1953)

35) C.B.HUGGINS, JAMA 192,(13) 111 (1965)

36) R.H.WILSON et al., Cancer Res. 1, 595 (1941)

37) H.C.SHAY et al., J.nat.Cancer Inst. 10, 255 (1949)

38) D.P.GRISWOLD et al., Cancer Res. 26, 2169 (1966)

39) H.MÜCKTER, E.MORÊ, Arzneimittel-Forsch. 16, 129 (1966)

40) M.N.TELLER et al., Cancer Res. 26, I, 254 (1966)

41) M.B.SHIMKIN et al., Cancer Res. 27, 1284 (1967)

42) T.L.DAO, Cancer Res. 22, 1163 (1962)

43) J.FRETZ et al., Arzneimittel-Forsch. 19, 1291 (1969)

44) M.E.WALL et al., J.med.Chem. 12, 810 (1969)

45) E.C.MILLER, J.A.MILLER, Mechanisms of Carcinogenesis,in H.BUSCH (ed.),The Molecular Biology of Cancer, Acad.Press Inc. New York und London, S. 389 (1974)

46) E.TAMULSKY, Cancer Res. 33, 3117 (1973)

47) B.JELLINEK, Cancer Res. 30, 1715 (1970)

48) J.BOOTH et al., Biochem.Pharmacol. 22, 1781 (1973)

49) D.P.GRISWOLD, Cancer Res. 30, 819 (1970)

50) J.L.MCGUIRE, R.D.LISK, Neuroendocrinology 4, 289 (1969)

51) R.HILF et al., Cancer Res. 31, 1195 (1971)

52) L.SIMPSON-HERREN, D.P.GRISWOLD, Cancer Res. 30, 813 (1970)

53) E.V.JENSEN, E.R.DESOMBRE, P.W.JUNGBLUT, Estrogen Receptors in Hormone-responsive Tissues and Tumors, in R.T.WIRSLER et al.(eds.),Endogenous Factors Influencing Host-Tumor-Balance, Univ.of Chicago Press Chicago,London, S.15(1967)

54) T.H.HAMILTON, Science (Washington) 161, 649 (1968)

55) D.T.STERENTHAL et al., Cancer Res. 26, 481 (1966)

56) B.G.MOBBS, J.Endocrin. 36, 409 (1966)

57) L.TERENIUS, Europ.J.Cancer 7, 65 (1971)

58) M.B.LIPSETT, Cancer Res. 29, 2408 (1969)

59) M.E.WALL et al., J.med.Chem. 15, 1158 (1972)

60) C.W.WELSCH et al., Cancer Res. 19, 1541 (1969)

61) J.MEITES et al., Ann.Rev.Physiol. 28, 57 (1966)

62) J.MEITES, The Relation of Estrogen and Prolactin to Mammary Tumorigenesis in Rat, in T.L.DAO(ed.), Estrogen Target Tissues and Neoplasia, Univ.of Chicago Press Chicago, London, S.275 (1972)

63) J.MEITES, Hypophysiotropic Hormones of the Hypothalamus: Assay and Chemistry, The Williams and Wilkins Co., S.261 (1970)

64) V.W.WELSCH, J.MEITES, Experientia 26, 1133 (1970)

65) K.H.LU, J.MLITES, Proc.Soc.exp.biol.Med. 137, 480 (1971)

66) T.HÖKFELD, K.FUXE, Neuroendocrinology 9, 100 (1972)

67) E.E.CASSELL et al., Cancer Res. 31, 1051 (1971)

68) I.C.HEUSON et al., Gynecol.Invest. 2, (1-6) 130 (1971-72)

69) T.L.DAO, Progress in Experimental Tumor Research Vol.11, F.HOMBERGER(ed.),S.Karger Verlag Basel, S.235 (1969)

70) C.W.WELSCH, J.A.CLEMENS, J.MEITES, J.nat.Cancer Inst. 41,465(1968)

71) G.WEBER, The Molecular Correlation Concept, in H.BUSCH(ed.), The Molecular Biology of Cancer, Acad.Press Inc. New York and London, S.489 (1974)

72) W.E.KNOX et al., Cancer Res. 29, 1669 (1969)

73) R.HILF et al., Cancer Res. 30, 1223 (1970)

74) R.HILF et al., J.nat.Cancer Inst. 50, 1395 (1973)

75) R.HILF et al., Cancer Res. 29, 977 (1969)

76) R.HILF, Biochim.biophys.Acta 232 753 (1971)

77) R.J.NICHOLSON et al., Europ.J.Cancer 9 313 (1973)

78) C.B.HUGGINS et al., Proc.nat.Acad.Sci. USA 737 (1964)

79) A.SOMOGYI, K.KOVACS, Cancer Res. 30, 1958 (1970)

80) K.ENGELBART, D.GERICKE, Z.Krebsforsch. 66, 316 (1964)

81) S.A.SCHEPARTZ et al., Cancer Res. 27,1.Suppl. 538 (1967)

82) L.SACHS, Statistische Auswertungsmethoden, Springer Verlag Berlin,Heidelberg,New York, 1.Aufl. (1968)

83) S.KOLLER, Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse, in HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, Handbuch der physiologisch- und phatologisch-chemischen Analyse, Bd.2/2, Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg, 10,Aufl., S.1011 (1955)

84) K.ÜBERLA, Modelluntersuchungen über die Verwendbarkeit der Varianzanalyse auf Zeit-Wirkungsverläufe, 13.Biometrisches Colloquium vom 13.3-2.4.1966 in Mainz (1966)

85) D.WINNE, Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Phathol.Pharmacol. 250, 383 (1965)

86) D.WINNE, Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Pathol.Pharmacol. 256, 383 (1967)

87) G.A.LIENERT, Biometr.Z. 7, 184 (1965)

88) H.GRIMM, Biometr.Z. 2, 164 (1960)

89) H.SCHEFFÉ, Biometrika 40, 87 (1953)

90) G.EGGINGER, Dissertation Universität München, in Vorbereitung

91) G.WOODARD, Methods of Animals Experimentation Vol.I, Acad.Press Inc. New York and London (1965)

92) D.LORENZ, Arch.Pharmaz. 36, 269 (1966)

93) W.BRANDT, Dissertation Universität München (1969)

94) J.MEITES, Amer.J.Physiol. 159, (11) 281 (1949)

95) D.G.MONTEMURRO, Can.J.Physiol.Pharmacol. 49, 554 (1971)

96) G.KRANZFELDER, Dissertation Universität München, in Vorbereitung

97) S.YOUNG et al., J.phathol.Bacteriol. 85, 331 (1953)

98) F.BRESCIANI et al., Federation Proc. 32, 187 (1973)

99) J.H.REDICK et al., Physiol.Behav. 10, 543 (1973)

100) L.GROPPER et al., Cancer Res. 27, 26 (1967)

101) A.TANNENBAUM, H.SILVERSTONE, Cancer Res. 9, 724 (1949)

102) F.R.WHITE, J.nat.Cancer Inst. 5, 43 (1944)

103) W.F.DUNNING, M.R.CURTIS, Cancer Res. 14, 299 (1954)

104) K.K.CAROLL et al., Can.med.Assoc.J. 98, 590 (1968)

105) A.TANNENBAUM, H.SILVERSTONE, Nutrition and Genesis of Tumors, in R.W.RAVEN(ed.), Cancer Vol.I, Butterworth and Co. London S.306 (1957)

106) K.K.CAROLL, H.T.KHOR, Cancer Res. 30, 2266 (1970)

107) J.P.GREENSTEIN, Biochemistry of Cancer, Acad.Press Inc. New York, 2.nd edition, S.237 (1954)

108) H.BUSCH,ed), An Introduction in the Biochemistry of the Cancer Cell, Acad.Press Inc. New York and London, S.313 (1962)

109) C.F.BARFKNECHT et al., J.med.Chem. 17, 308 (1974)

110) H.ZAUNSCHIRM, Liebigs Ann. Chem. 245, 279 (1888)

111) W.J.HALE, N.A.LANGE, J.Amer.chem.Soc. 42, 112 (1920)

112) E.LUTZ et al., J.Org.Chem. 12, 760 (1947)

113) H.SCHIFF, Liebigs Ann.Chem. 140, 93 (1866)

114) H.RUPE, E. HODEL, Helv.chim.Acta 6, 879 (1923)

115) V.E.HAURY, U.S. 2692283 (1954)

116) K.v.ANWERS, H.WUNDERLING, Ber.dtsch.chem.Ges. 65, 77 (1932)

117) P.L.PICKARD, S.H.JENKINS, J.Amer.chem.Soc. 75, 5899 (1953)

118) T.J.CROWELL et al., J.Amer.chem.Soc. 86, 4973 (1964)

119) H.SCHÖNENBERGER, A.RAPPL, Arch.Pharmaz. 300, 483 (1967)

120) H.SCHÖNENBERGER, Studium Generale 20, 780 (1967)

121) H.SCHÖNENBERGER, Habilitationsschrift Universität München (1959)

122) F.A.v.METSCH, Angew.Chem. 65, 586 (1953)

123) R.DIETZEL, W.PAUL, Arch.Pharmaz. 273, 507 (1935)

124) L.THER, Grundlagen der Experimentellen Arzneimittelforschung, Wiss.Verlagsgesellschaft Stuttgart (1965)

125) C.B.HUGGINS, F.BRILLANTES, Nature (London) 189, 204 (1961)

126) P.E.SCHURR, Cancer Res. 29, 258 (1969)

127) F.KNAPPEN et al., Arzneimittel-Forsch. 21, 2046 (1971)

128) R.A.TURNER, P.HEBBORN(eds.), Screening Methods in Pharmacology, Vol.II Acad.Press Inc. New York, S.90 (1971)

129) I.R.GEIGY AG, Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 6.Aufl. S.125 (1960)

LEBENSLAUF

Eckhard Hoffmann	geboren am 8.7.1944 in Ahrensburg als Sohn des Lehrers Günter Hoffmann und seiner Ehefrau Erika, geb. Wohlers. Seit 1969 verheiratet mit Sigrun Hoffmann, geb.Stenner 2 Kinder
Schulbildung	1950 - 1954 Volksschule Hohenschäftlarn 1954 - 1963 Realgymnasium Icking
Reifeprüfung	Juli 1963 in Icking
Wehrdienst	Oktober 1963 - September 1964 in Wesendorf, Itzehoe, München und Hannover
Berufsausbildung	
Praktikantenzeit	1964 - 1965 Apotheke der Klinischen Universitätsanstalten in München 1965 - 1966 Marienapotheke Wolfratshausen
Pharmazeutisches Vorexamen	September 1966 in München
Studium der Pharmazie	WS 1966/67 bis SS 1969 Universität München
Pharmazeutische Prüfung	Oktober 1969
Wissenschaftliche Arbeit	Seit November 1969 unter Anleitung von Herrn Professor Dr.H.Schönenberger am Institut für Pharmazie und Lebensmittel- chemie der Universität München
Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle	seit April 1971 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München